

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1966

N°

THÈSE 746

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

PAR

Pierre FREYCHET

né le 23 avril 1935 à Philippeville (Algérie)

Présentée et soutenue publiquement le :

CONTRIBUTION A L'ETUDE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DE
L'HORMONE THYREOTROPE HYPOPHYSAIRE.

Résultats obtenus avec une thyroestimuline bovine radio-iodée
et des antisérums anti-thyroestimuline bovine et
anti-thyroestimuline porcine.

Président : M. DEROT, Professeur.

EDITIONS A.G.E.M.P. — 8, RUE DANTE . PARIS-V^e

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1966

N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

PAR

Pierre FREYCHET

né le 23 avril 1935 à Philippeville (Algérie)

Présentée et soutenue publiquement le :

CONTRIBUTION A L'ETUDE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DE
L'HORMONE THYREOTROPE HYPOPHYSAIRE.

Résultats obtenus avec une thyroestimuline bovine radio-iodée
et des antisérums anti-thyroestimuline bovine et
anti-thyroestimuline porcine.

Président : M. DEROT, Professeur.

EDITIONS A.G.E.M.P. — 8, RUE DANTE · PARIS-V^e

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gaudart d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutailis (D.), Piédelièvre (R.), Quènu (J.), Renard (G.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN Georges BROUET.

1^{er} ASSESSEUR } Daniel BARGETON

2^e ASSESSEUR } Jean GOSSET

I. — PROFESSEURS**1^o CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES****a) Professeurs titulaires :****MM.**

Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
—	POLONOVSKI (J.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
—	DOGNON (A.)
—	DJOURNO (A.)
Cancérologie médicale et sociale	DENOIX (P.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
—	KUSS (R.)
—	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
—	BRICAIRE (H.)
—	PÉQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	N...
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
—	LEVY (Mlle J.)
Physiologie	BARGETON (D.)
—	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)

Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale
Thérapeutique
Thérapeutique appliquée

MM.
CAUCHOIX (J.)
CONTE (M.)
LAMOTTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie anthropologique
Anatomie pathologique
Bactériologie

OLIVIER (G.)
NEZELOF (Ch.)
BARBIER (P.)
DESGREZ (P.)
DREYFUS (J.-Cl.)

Biochimie médicale

BOURLIÈRE (F.)

Biologie médicale

COUJARD (R.)

Histologie

LARIVIÈRE (M.)

Parasitologie

LOEPER (J.)

Pathologie expérimentale

RICHET (G.)

DEJOURS (P.)

Physiologie

ROUCAYROL (J.-Cl.)

SCHERRER (J.)

KELLERSHOHN (L.)

Physique médicale

GOUGEROT (L.)

TUBIANA (M.)

Radiologie médicale

FISCHGOLD (H.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

MM.

Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)

REDON (H.)

Clinique cardiologique (Broussais)

SOULIÉ (P.)

— — (Boucicaut)

LENÈGRE (J.)

Beaujon

LORTAT-JACOB (J.-L.)

—

N...

Cliniques chirurgicales

Cochin

LEGER (L.)

Hôtel-Dieu

PATEL (J.)

Saint-Antoine

GOSSET (J.)

Salpêtrière

SICARD (A.)

Tenon

OLIVIER (Cl.)

Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)

MERLE d'AUBIGNÉ (R.)

(Foch)

PADOVANI (P.)

Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)

FÈVRE (M.)

Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)

DUBOST (Ch.)

Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)

MATHEY (J.)

Clinique dermatologique (Saint-Louis)

DUPERRAT (F.)

Clinique endocrinologique (Pitié)

DECOURT (J.)

Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)

LAMY (M.)

Clinique gynécologique (Broca)

HUGUIER (J.)

Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)

DEGOS (R.)

Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)

TURPIN (R.)

Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)

MOLLARET (P.)

Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)

DELAY (J.)

Clinique des maladies métaboliques (Necker)

HAMBURGER (J.)

Clinique des maladies du sang (Broussais)

BERNARD (J.)

Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)

CASTAIGNE (P.)

Bicêtre

DEPARIS (M.)

Broussais

MILLIEZ (P.)

Cochin

BROUET (G.)

Hôtel-Dieu

BARIÉTY (M.)

Lariboisière

SÈZE (S. de)

Pitié

DREYFUS (G.)

Saint-Antoine

KOURILSKY (R.)

Saint-Antoine

BOUDIN (G.)

Cliniques médicales

Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales	LACOMME (M.)
Baudelocque	MERGER (R.)
Saint-Antoine	VARANGOT (J.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	OFFRET (G.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	BREGEAT (P.)
— (Cochin)	AUBRY (M.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	MOZZICONACCI (P.)
Clinique de pédiatrie	THIEFFRY (S.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	BERNARD (E.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	MICHAUX (L.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	COSTE (F.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	DECHAUME (M.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	LEMAIRE (A.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	GAULTIER (M.)
Clinique toxicologique	JUDET (R.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré)	ABOULKER (P.)
Clinique urologique (Cochin)	COUVELAIRE (R.)
— (Necker)	LAPLANE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	DOMART (A.)
Séméiologie médicale (A. Chantin)	BOUVRAIN (Y.)
— (Lariboisière)	RAMBERT (P.)
— (Pitié)	WOLFROMM (R.)
— (Rothschild)	POILLEUX (F.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais)	

b) Professeurs à titre personnel :

Hématologie	ANDRÉ (R.)
	BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
	AZERAD (E.)
	BOUR (H.)
	CABROL (Ch.)
	GROSSIORD (A.)
	LAMBLING (A.)
Médecine	LAUNAY (Cl.)
	PAYET (M.)
	PERRAULT (M.)
	SIGUIER (F.)
	WORMS (R.)
Neuro-chirurgie	LE BEAU (J.)
Neurologie	LHERMITTE F.
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
	POLONOVSKI (Cl.)
Pédiatrie	ROYER (P.)
	KREIS (B.)
Pneumo-Phtisiologie	MEYER (A.)
Rhumatologie	DELCARRE (C.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM.		MM.
Anatomie pathologique . . .	BOUYSSOU (Ch.)	Hématologie	BILSKI-PASQUIER (B.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)	Maladies infectieuses . . .	DUPONT (V.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)	Physique médicale	{ COURSAGET (J.) GREMY (F.)
Biochimie médicale	{ CARTIER (P.) GONNARD (P.)	Physiologie	GIRARD (Fr.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)	Stomatologie	CHAPUT (M ^{me} A.)
		Thérapeutique	CHASSAGNE (P.)

III. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

IV. — PROFESSEUR ASSOCIÉ

Statistique médicale et épidémiologique . .	SCHWARTZ (D.)
---	---------------

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseillers administratifs	Mlle CHAINTREUIL (G.) M. FAYE (R.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque . .	{ M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	
Conservateurs	{ Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.),
Bibliothécaires	{ Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), Dr SCHILLER (J.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A la mémoire de mon père

A tous les miens

A mes amis



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549020_0025

A Monsieur le Professeur Maurice D E R O T

qui me fait le très grand honneur
de présider le Jury de cette thèse.

Le semestre passé dans son Service
a été bien trop bref. Sa bienveillance
me permet d'y revenir bientôt
pour un séjour moins fugace.

Qu'il veuille bien accepter l'expression
de ma profonde reconnaissance.

A mes Maîtres de la Faculté

A mes Maîtres dans les Hôpitaux :

Externat - Monsieur le Docteur ALBEAUX-FERNET

Monsieur le Professeur BOUDIN

Monsieur le Professeur GILBERT-DREYFUS

Monsieur le Docteur LAYANI, in memoriam

Monsieur le Professeur SENEQUE

Internat - Monsieur le Professeur AZERAD

Monsieur le Professeur BOUDIN

Monsieur le Professeur DECOURT

Monsieur le Professeur DEROT

Monsieur le Professeur GILBERT-DREYFUS

Monsieur le Docteur LAYANI, in memoriam

Monsieur le Professeur TURPIN

Monsieur le Professeur WOLFROMM

Au Docteur Peter CONDLIFFE

Son don généreux d'hormone purifiée
m'a permis la réalisation de ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici un modeste
témoignage de ma vive reconnaissance.

Au Docteur Marcel LEGRAIN

Professeur Agrégé, Médecin des Hôpitaux.

L'exceptionnelle qualité médicale et humaine
de son enseignement a profondément marqué le cours de mon Internat.
Qu'il veuille bien accepter l'expression de toute ma gratitude.

Au Docteur Gabriel ROSSELIN

Il m'a accueilli au sein de l'équipe qu'il a toujours animée.
Il m'a constamment aidé au cours de ce travail qu'il a inspiré.
Je lui dois bien plus que le sujet de cette Thèse.
Qu'il veuille bien accepter l'expression de toute mon amitié.

Au Professeur Agrégé Georges TCHOBROUTSKY

Il m'a fait bénéficier de son enseignement quotidien
et m'a patiemment assisté dans l'élaboration de cette Thèse.
Je lui dois la joie de faire partie du groupe qu'il dirige.
Qu'il veuille bien accepter l'expression de toute mon amitié.

Au Docteur Roger ASSAN

Nous partageons de communs souvenirs, récents et plus anciens.
Qu'il reçoive ici l'expression de ma gratitude pour l'aide
et la compréhension qu'il m'a toujours apportées.

A Monsieur Jacques DROUET

Il a été le témoin patient de débuts souvent laborieux.
Qu'il veuille bien accepter l'expression de toute mon amitié.

A Mademoiselle Jacqueline DOLAIS, que j'ai souvent mise à contribution.

A Mesdemoiselles GRAPIN et GRENIER, pour leur aide si précieuse.

A tous mes Amis du Groupe de Recherche de Diabétologie et d'Etudes
Radio-immunologiques de l'Institut National de la Santé et
de la Recherche Médicale.

C'est avec leur aide constante que ce travail a pu être effectué.

I N T R O D U C T I O N

En 1934, Collip et Anderson observaient, après des injections d'extraits hypophysaires répétées de façon prolongée à des rats, un épuisement de l'action thyroostimulante de ces préparations et ils démontraient que le sérum des animaux devenus réfractaires à cet effet biologique possédait une action antithyréotrope (2,11). La nature immunologique de ce phénomène "antihormone" fut ensuite reconnue (14, 33, 36). Les hormones protéiques étudiées jusqu'à ce jour sont antigéniques; elles forment avec leurs immunosérums spécifiques un complexe hormone-anticorps antihormone.

Des anticorps sériques anti-thyroostimuline (TSH) bovine ont été obtenus chez le lapin (1, 3-6, 10, 14, 16, 17, 23, 25, 28, 31, 34, 37-40), le cobaye (22, 31, 33, 36), le rat (11), le cheval (2, 4), et chez l'homme (3, 19). Des anticorps anti-TSH porcine (20, 27) et anti-TSH humaine (1, 3, 26, 27, 34, 35) ont été produits chez le lapin.

Des procédés biologiques ou immunologiques (généralement associés) sont utilisés pour détecter la présence d'anticorps spécifiques dans des antisérums anti-TSH. "In vivo", les procédés biologiques apprécient la neutralisation, par un antisérum anti-TSH bovine, anti-TSH porcine, ou anti-TSH humaine, de l'effet d'une TSH homologue (1, 2, 4, 10, 11, 17, 19, 20, 23, 25, 27, 33, 34, 38, 39) ou hétérologue (1, 19, 23, 25, 27, 34, 37, 39) sur l'activité thyroïdienne du poussin, de la souris, ou du cobaye. On a pu observer dans certains cas la neutralisation de la TSH endogène chez des rats (5, 17,28),

des souris et des cobayes (17) soumis à des injections d'antisérum de lapin anti-TSH bovine. "In vitro", l'effet de la TSH bovine sur le poids de coupes de thyroïde de boeuf a été neutralisé par un antisérum de lapin anti-TSH bovine (23). Une inhibition de l'effet lipolytique, exercé "in vitro" par la TSH sur la graisse épидидymaire du rat, a été obtenue, de façon spécifique, avec des antisérums de lapin anti-TSH bovine très dilués (6, 24).

Les procédés immunologiques généralement utilisés sont l'immuno-diffusion et la précipitation spécifique en milieu gélifié (10, 20, 26, 27, 34, 38); l'immunoélectrophorèse (3, 20, 26, 34, 40); l'agglutination spécifique, par un immunsérum anti-TSH, d'hématies traitées par l'acide tannique ou par la bis-diazo-benzidine pour servir de support à une TSH homologue (3, 10, 16, 19, 23, 24, 27, 31, 39, 40) ou hétérologue (3, 23, 27, 31, 39) et l'inhibition de cette hémagglutination par des quantités connues de TSH homologue ou hétérologue ajoutées au milieu d'incubation.

Les résultats obtenus lors d'une étude radio-immunologique effectuée à partir de préparations purifiées de TSH bovine et humaine ont été publiés en 1963 (34). Depuis, les premiers résultats concernant la détermination des taux plasmatiques de la TSH humaine par des techniques radio-immunologiques ont été rapportés (22, 26, 35).

Nous avons marqué par l'iode 131 une TSH bovine hautement purifiée et nous avons utilisé la méthode radio-immunologique de Berson et Yalow (7-9, 15, 29, 30, 41) pour étudier un certain nombre d'antisérums de cobaye anti-TSH bovine et anti-TSH porcine.

Chapitre I - MATERIEL ET METHODES

I - PREPARATIONS HORMONALES UTILISEES

Nous avons employé :

a) Pour l'iodation et pour la préparation des "standards" de référence d'hormone non iodée, une TSH bovine hautement purifiée (12, 13) généreusement offerte par le Dr P.G. Condliffe (National Institute of Health, Bethesda). L'activité biologique de cette préparation était de 40 U.I./mg en juillet 1964. L'hormone a été conservée à l'état sec et, pour la préparation des standards, mise en solution dans du tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6, contenant 2,5 pour mille d'albumine humaine (α), et congelée à -20°C .

b) Pour l'immunisation des cobayes, une TSH bovine (β) et une TSH porcine (γ) commerciales.

L'activité biologique de ces préparations est de 0,7 à 0,8 u. USP/mg (1 u. USP = 1 U.I.)

II - ANTISERUMS ANTI-TSH

Les antisérums anti-TSH ont été préparés par injections hebdomadaires sous-cutanées de TSH bovine (4 u. USP par injection) et de TSH porcine

(α) Centre National de la Transfusion Sanguine
(β) Thyrotrope Choay, Lot 64 P2) aimablement fournies par les Drs
(γ) Thyrostimuline Endo, Lot SG. P4) Bordes (Choay) et Lecoq (Endopancrine-Organon), que nous remercions.

(5 u. USP par injection) à deux groupes respectifs de quatre et de huit cobayes. Les deux premières injections ont été pratiquées avec de l'adjuvant complet de Freund (1 ml d'adjuvant pour 1 ml de solution hormonale); les injections suivantes avec de l'adjuvant incomplet. Le premier prélèvement a été effectué par ponction cardiaque quinze jours après la cinquième injection. Les sérums ont été stockés à -20°C après addition de merthiolate au 1:10 OCO. Un antisérum de lapin anti-TSH bovine nous a été aimablement fourni par M. Y.A. Fontaine (Laboratoire de Physiologie Générale et Comparée, Museum d'Histoire Naturelle, Paris).

III - IODATION

Les iodations ont été effectuées selon la méthode de Hunter et Greenwood (21), en utilisant, pour chaque marquage, 2 à 3 millicuries d'Iode 131 (Iode S3 Saclay), 5 microgrammes de TSH bovine purifiée, 100 microgrammes de chloramine T, la réaction étant arrêtée par 240 microgrammes de métabisulfite de sodium.

Après les iodations, les solutions de marquage ont été soumises à différentes techniques de fractionnement :

1) Chromatographie sur une colonne (1 x 3 cm) de résine IRA 400, forme chlore, éluée par de l'albumine humaine en solution aqueuse à 7 pour mille.

2) Chromatographie sur poudre de cellulose, en lavant par du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,5, et en éluant par du tampon phosphate albumineux à 7 pour mille, puis par du plasma non dilué, selon la technique de Berson et Yalow.

3) Electrophorèse verticale en gel d'amidon en tampon glycine, pH 9,5, pendant 18 heures à 8 volts/cm. Après congélation et autoradiographie du gel, l'extraction des fractions radio-actives est réalisée à partir de tranches de section effectuées transversalement de 1 à 6 cm de l'origine (l'albumine ayant migré à environ 10 cm de l'origine).

4) Filtration à travers un gel de dextran : nous avons employé du Séphadex G 100 (forme bead), la colonne (2,5 x 30 cm) étant équilibrée et éluée par du tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6, contenant 2,5 pour mille d'albumine humaine; l'effluent est recueilli par fractions de 0,5 ou de 1 ml.

Les fractions iodées sont congelées à -20°C , en tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6, albumine humaine 2,5 pour mille.

IV - PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Toutes les incubations sont effectuées dans du tampon véronal 0,05 M, pH 8,6, contenant 2,5 pour mille d'albumine humaine et du sérum de cobaye normal à la dilution de 1 pour cent.

1°) Séparation de l'hormone libre (F) et du complexe hormone-antihormone(B)

a) La séparation sur papier par rhéoelectrophorèse est la méthode de référence qui permet de suivre l'ensemble du phénomène (7-9, 29, 30, 41). L'hormone libre, en micro-quantité, est adsorbée au point de dépôt tandis que le complexe hormone-antihormone migre avec les protéines entraînées par le flux rhéoelectrophorétique. Nous avons généralement employé du papier de cellulose Whatman 3 MC; la migration est réalisée en tampon véronal 0,05 M, pH 8,6. Nous avons également utilisé du papier Whatman de DEAE-cellulose.

Pour un type et un lot de papier déterminés, l'adsorption au point de dépôt de la TSH libre et la migration avec les protéines du complexe TSH-anticorps anti-TSH dépendent de la quantité de protéine déposée. Après séchage rapide des bandes, les pics d'activité sont mesurés par passage dans un lecteur de chromatogrammes. (α)

b) Nous avons également pratiqué la précipitation élective du complexe hormone-anticorps de cobaye par un sérum de lapin anti-globulines de cobaye (18, 32).

2°) Analyse des fractions iodées.

Pour déterminer la fraction iodée immunologiquement la plus réactive, chaque fraction a été analysée dans un volume final constant de 0,5 ou de 1 ml, en présence :

- a) du seul tampon;
- b) de TSH non iodée en excès par rapport à l'hormone marquée;
- c) d'un immunsérum anti-TSH;
- d) du même immunsérum et de l'excès de TSH non iodée.

La concentration en TSH-¹³¹I est, dans chaque tube, de 1 nanogramme par ml. L'excès de TSH non iodée est de 500 nanogrammes par ml. L'immunsérum se trouve généralement à la dilution finale de 1:1000. Les incubations sont effectuées à +4°C pendant 12 à 15 heures, ou à +20°C pendant 1 heure.

3°) Etude des antisérums

a) La détection des anticorps a été effectuée en employant les mêmes modalités expérimentales que celles utilisées pour l'analyse des

(α) Elliot Automation, France.

fractions iodées, après avoir choisi la fraction la plus réactive immunologiquement.

b) Un certain nombre d'immunsérums anti-TSH bovine et anti-TSH porcine ont été étudiés de façon quantitative. En présence d'une quantité constante de traceur hormonal (0,1 nanogramme par ml de milieu d'incubation), les immunsérums ont été analysés à dilution croissante; puis à dilution constante, en présence d'une quantité variable d'antigène (traceur hormonal plus une quantité déterminée d'hormone non iodée). Le détail de ces protocoles est indiqué dans les légendes des figures 7 et 8. Les incubations sont effectuées à +4°C pendant 4 à 5 jours.

4°) Etude quantitative du système TSH-anticorps anti-TSH.

Si l'on introduit des quantités croissantes connues d'hormone purifiée non iodée (dite "standard") dans une zone quantitativement définie de traceur hormonal et d'anticorps, l'hormone marquée et l'hormone non marquée entrent en compétition pour se lier avec l'anticorps (9). Dans ces conditions, la fraction du traceur liée à l'anticorps (B*) diminue par rapport à la fraction initialement liée (en l'absence d'hormone non iodée) en fonction des quantités de standard introduites dans le milieu d'incubation, et la fraction du traceur libre (F*) augmente. La courbe "standard" est établie en portant le rapport $\frac{B^*}{F^*}$ en fonction des concentrations croissantes connues d'hormone non iodée dans le milieu d'incubation. Le taux plasmatique d'un échantillon inconnu peut être apprécié par comparaison des effets obtenus sur le même système rapportés à la courbe standard (18, 41). Nous avons ainsi étudié un système TSH bovine - ^{131}I - anticorps anti-TSH bovine et TSH bovine - ^{131}I - anticorps anti-TSH porcine en présence de quantités croissantes de TSH bovine et de TSH porcine non iodées et nous avons comparé les effets obtenus sur les mêmes systèmes de référence avec quelques plasmas humains.

Chapitre II - R E S U L T A T S

I - IODATION

Le rendement de marquage (pourcentage de ^{131}I fixé sur la protéine) est déterminé sur une partie aliquote de la solution de marquage par précipitation trichloracétique des protéines iodées ou mieux, en séparant l'iode libre par rhéoelectrophorèse sur papier (fig. 1). Cinquante à 90 p. cent de la radioactivité utilisée sont fixés sur l'hormone. Nous avons ainsi obtenu des préparations de TSH bovine radio-iodée dont l'activité spécifique était comprise, selon les marquages, entre 200 et 300 microcuries par microgramme.

II - CONDITIONS PROTEIQUES OPTIMA DE L'ANALYSE RHEOELECTROPHORETIQUE

1°) Sur papier Whatman 3 MC (bandes de 4 cm de large), nous avons constaté que, en l'absence d'antisérum spécifique, le pic d'activité de la TSH bovine radio-iodée tendait à s'éluer du point de dépôt lorsque la quantité de protéine déposée simultanément excédait celle représentée par un volume de plasma non dilué (ou d'albumine en solution à 8 pour cent) égal à 20 microlitres. L'élution de la TSH bovine ^{131}I est quasi totale au-delà de 200 microlitres de plasma ou d'albumine à 8 pour cent (fig. 2). Lors de la chromatographie de la solution de marquage sur poudre de cellulose, nous avons également obtenu une élution de l'activité hormonale par de faibles quantités de protéine.

Les conditions protéiques optima qui, avec le type et le lot de papier utilisés, nous ont permis une bonne séparation entre l'hormone libre

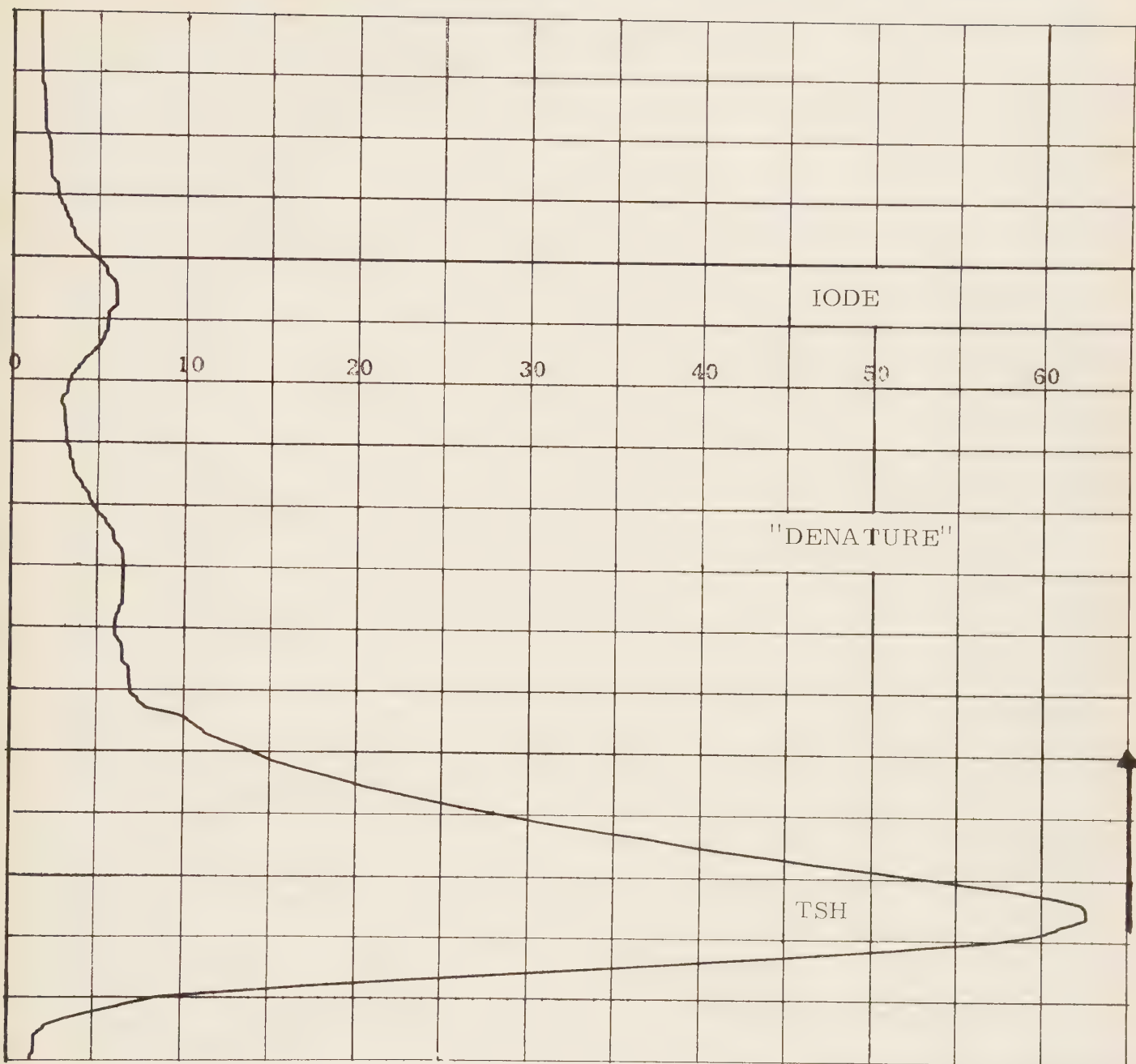
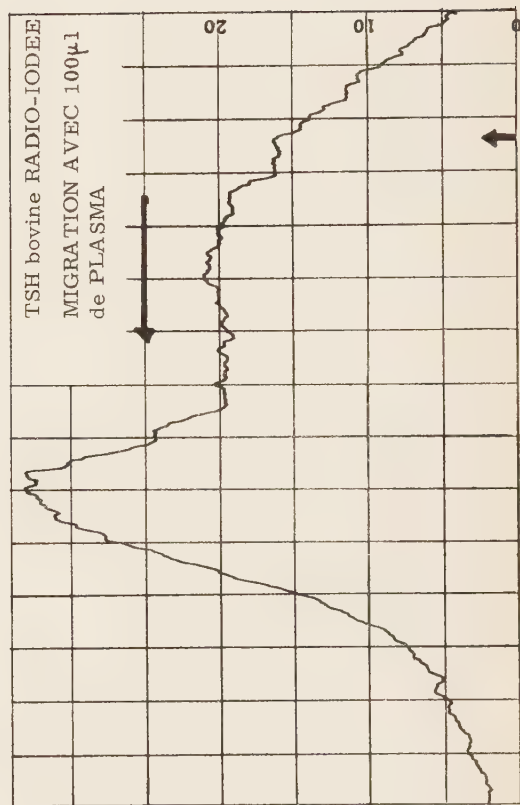
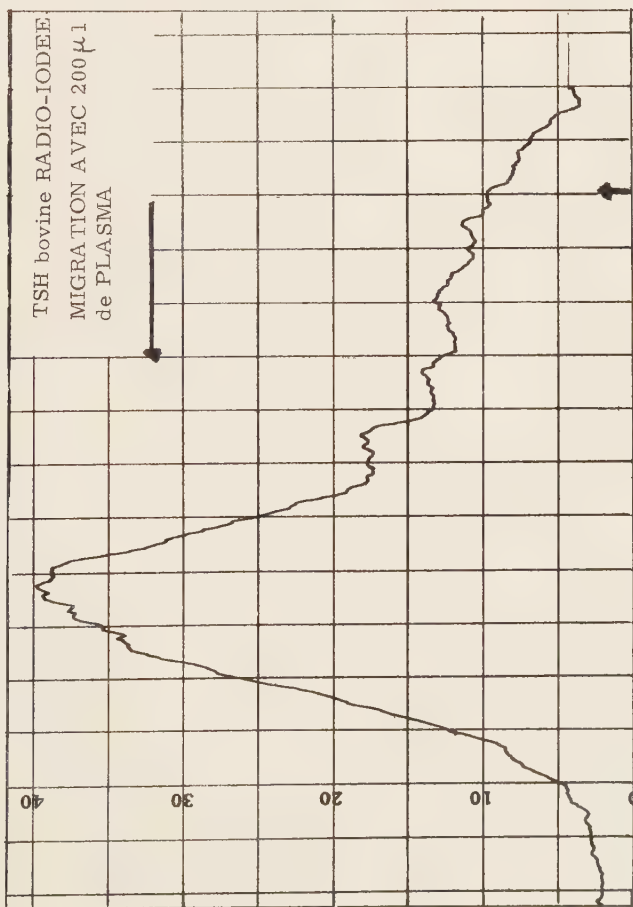
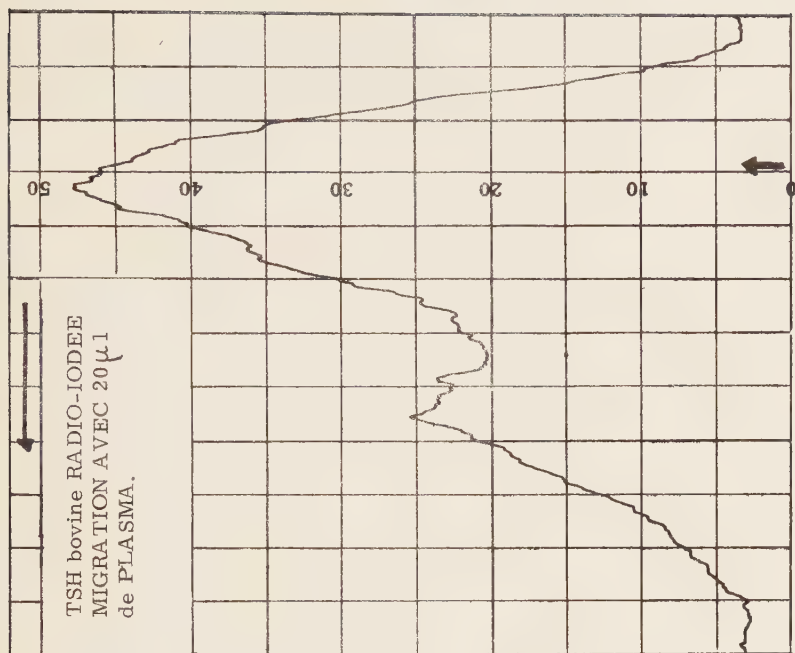


Figure 1 - Migration rhéoelectrophorétique d'une partie aliquote de la solution de marquage de TSH bovine. Papier de cellulose Whatman 3 MC (4cm de large). Dépôt de 200 microlitres contenant 15 microlitres d'albumine humaine à 8 %. Migration rhéophorétique à l'air libre à + 4°C pendant 90 minutes suivie de 30 minutes d'électrophorèse (12 V/cm). Tampon véronal 0,05 M, pH 8,6.



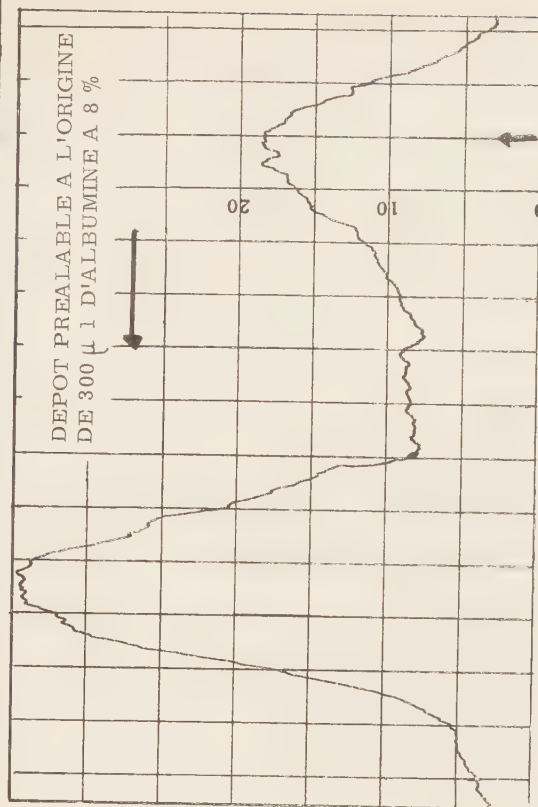
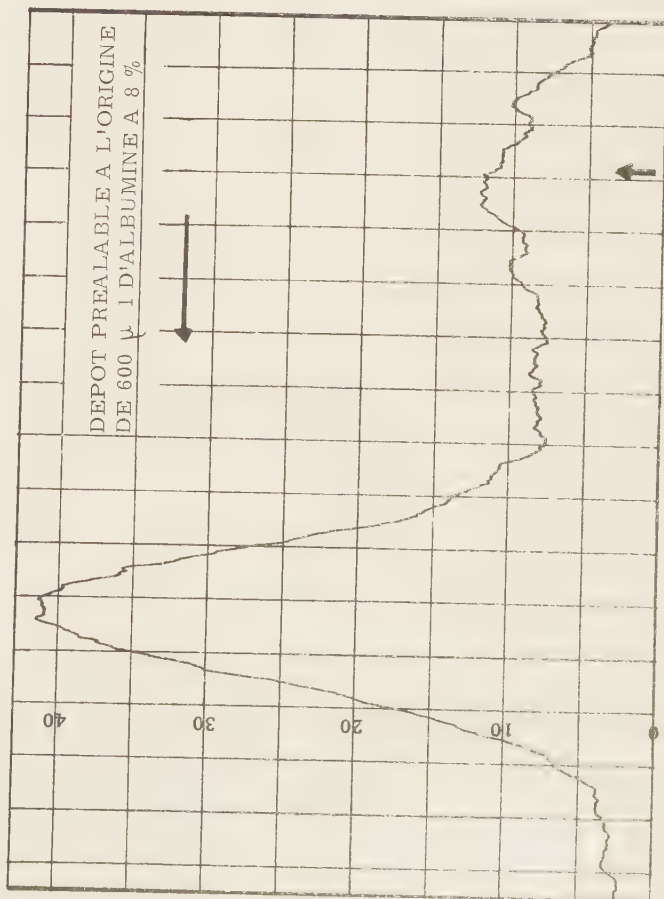
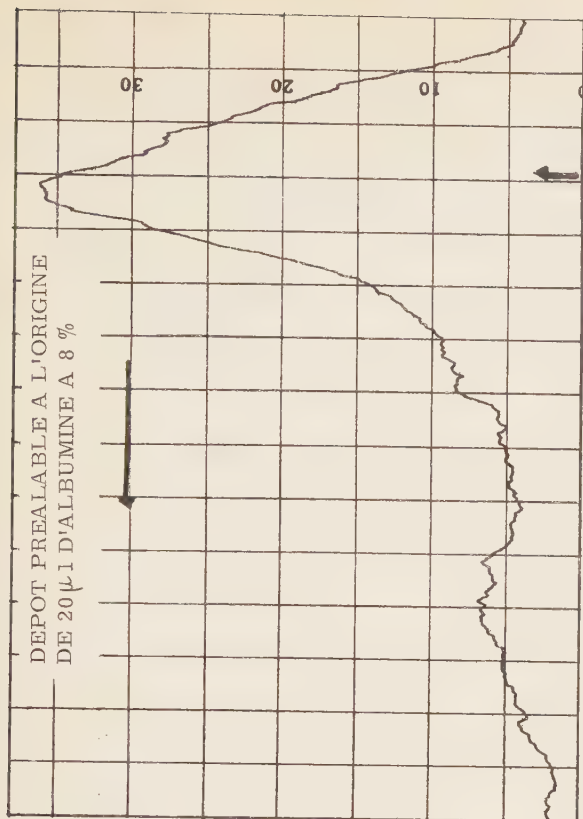
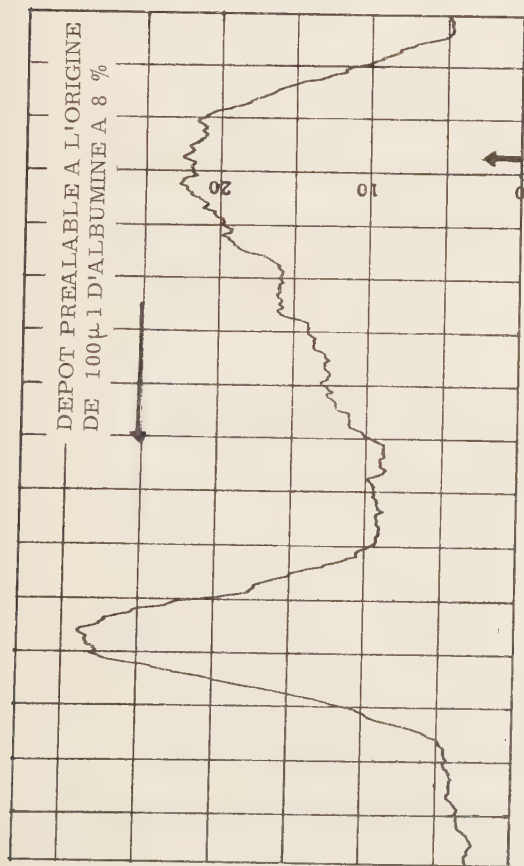


Figure 3 - Conditions protéiques de séparation de l'hormone libre et du complexe hormone-anticorps sur papier de DEAE, - cellulose (4cm de large).

TSH bovine 131 I (fraction iodée obtenue après électrophorèse en gel d'amidon de la solution de marquage).
Antisérum de cobaye anti-TSH bovine au 1:100
Incubation pendant 3 jours à + 4°C.

- Electrophorèse à l'air libre à + 4°C, pendant 90 à 120 minutes, 12 V/cm, gradient hydrostatique de 13 cm, tampon véronal 0,05 M, pH 8,6.

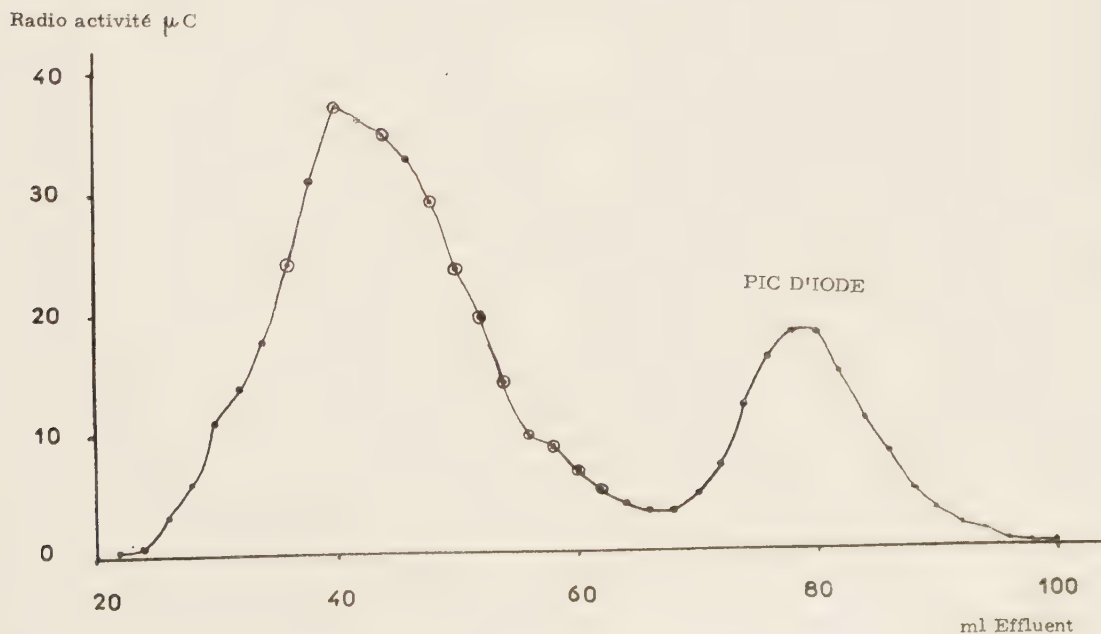
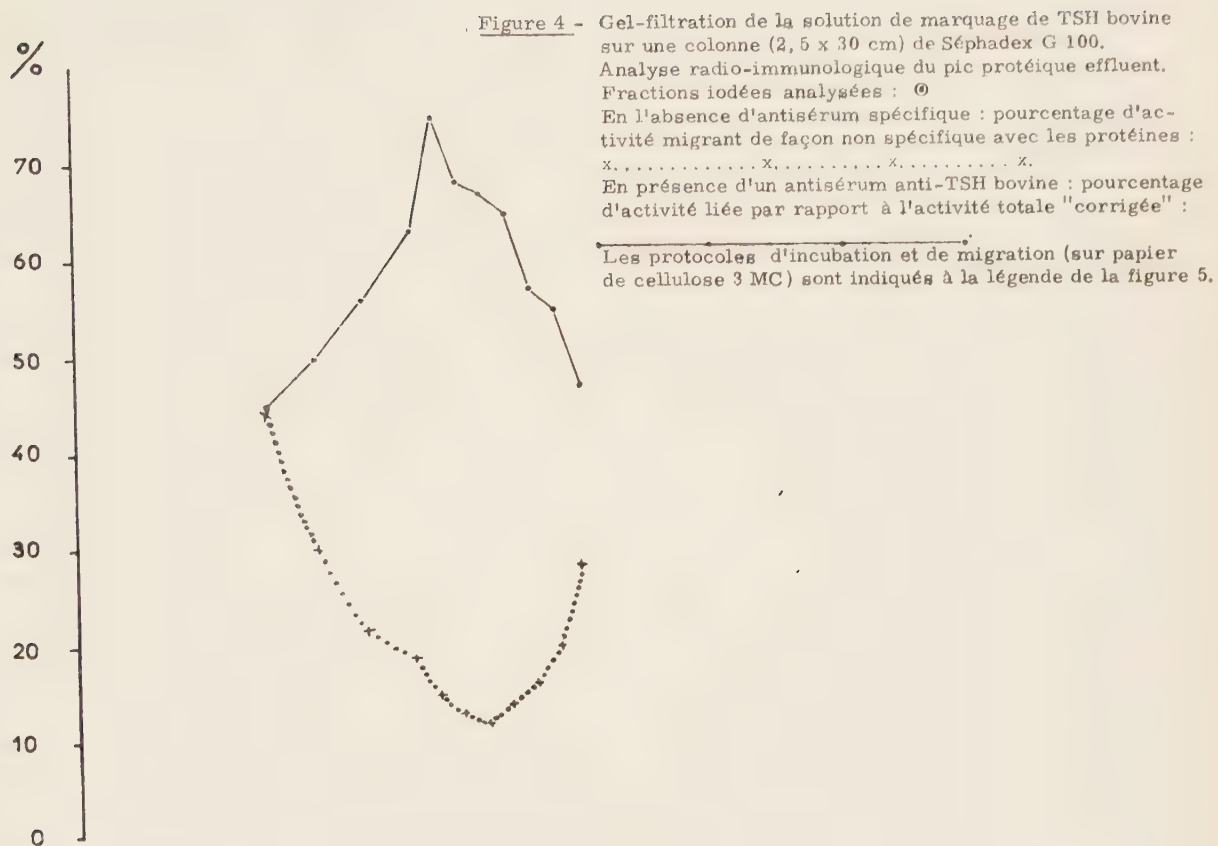
qui reste adsorbée à la cellulose au point de dépôt et l'hormone liée à l'anticorps qui migre avec les protéines sous l'influence du flux rhéoelectrophorétique, sont réalisées par un dépôt simultané de 15 à 20 microlitres de plasma non dilué. Du plasma humain ou de l'albumine humaine en solution à 8 pour cent ou du sérum de mouton ont été utilisés.

2°) Nous avons également employé du papier Whatman de DEAE-cellulose. Sur ce papier (bandes de 4 cm de large), en l'absence d'antisérum, l'élution de la TSH bovine - 131 I adsorbée au point de dépôt n'a commencé de se produire qu'après une saturation préalable de la zone de dépôt par un volume de 100 microlitres de plasma ou d'albumine en solution à 8 pour cent. L'élution n'est encore que partielle lorsque la présaturation est réalisée par 600 microlitres de plasma.

Avec un antisérum anti-TSH, la séparation entre l'hormone libre et le complexe hormone-antihormone a été obtenue en saturant préalablement la zone de dépôt par 200 à 300 microlitres de plasma ou d'albumine en solution à 8 pour cent (fig. 3).

III - ANALYSE DES FRACTIONS IODEES

1°) En l'absence d'antisérum spécifique (TSH bovine - 131 I seule dans du tampon), le pourcentage d'activité migrant de façon non spécifique avec les protéines varie légèrement d'une fraction à l'autre, pour un même procédé de fractionnement. Le pourcentage d'activité restant adsorbée au point de dépôt a été de 70 à 80 pour cent pour les fractions analysées après chromatographie sur résine IRA 400, sur poudre de cellulose, et après électrophorèse en gel d'amidon. Après passage sur Séphadex G100, les fractions iodées pro-



venant de la partie moyennement retardée du pic protéique ont été adsorbées à environ 85 pour cent au point de dépôt sur papier de cellulose 3 MC, alors que les autres fractions sont plus faiblement adsorbées. Le pourcentage d'activité migrant avec les protéines de façon non spécifique, et qui est présumé représenter l'hormone "endommagée", est donc de 15 % pour les fractions recueillies à la partie moyenne de la pente descendante du pic protéique effluent du Séphadex G 100 (fig. 4). Pour ces mêmes fractions, ce pourcentage est de 20 à 25 pour cent après 5 à 6 jours à +4°C. La présence de plasma dans le milieu d'incubation, à la dilution finale de 1:10, n'a pas augmenté, d'une façon habituelle, l'importance de cette migration non spécifique.

2°) En présence d'un antisérum anti-TSH bovine, le pourcentage d'activité migrant avec les protéines est variable selon la fraction analysée (fig. 4). L'activité totale immunologiquement réactive (dite "corrigée") est celle obtenue après déduction de la fraction de l'activité qui migre de façon non spécifique avec les protéines en l'absence de l'antisérum.

3°) La liaison de l'hormone iodée avec l'anticorps est inhibée par l'adjonction d'hormone non iodée, en excès par rapport à l'hormone marquée (fig. 5 et 6). L'inhibition compétitive réalisée par l'excès de TSH bovine non iodée en présence de la TSH bovine marquée et de l'antisérum est variable selon les fractions recueillies. Cette inhibition a été quasi totale pour les fractions moyennement retardées du pic protéique après passage sur Séphadex G 100 (fig. 5). Nous avons vérifié que l'excès de TSH non marquée n'entraînait en lui-même aucune élution du pic d'activité de la TSH iodée lors de la migration rhéoelectrophorétique.

La filtration à travers un gel de dextran (Séphadex G 100) de la

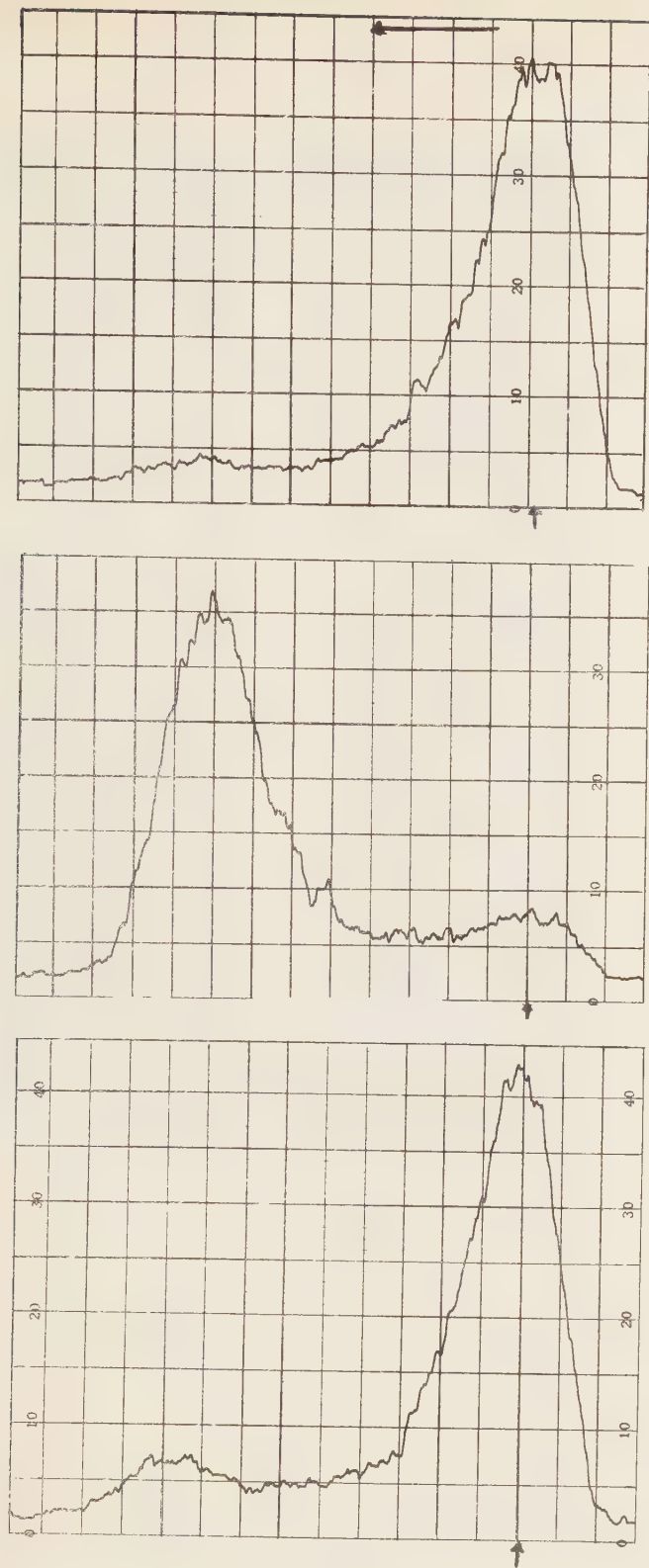
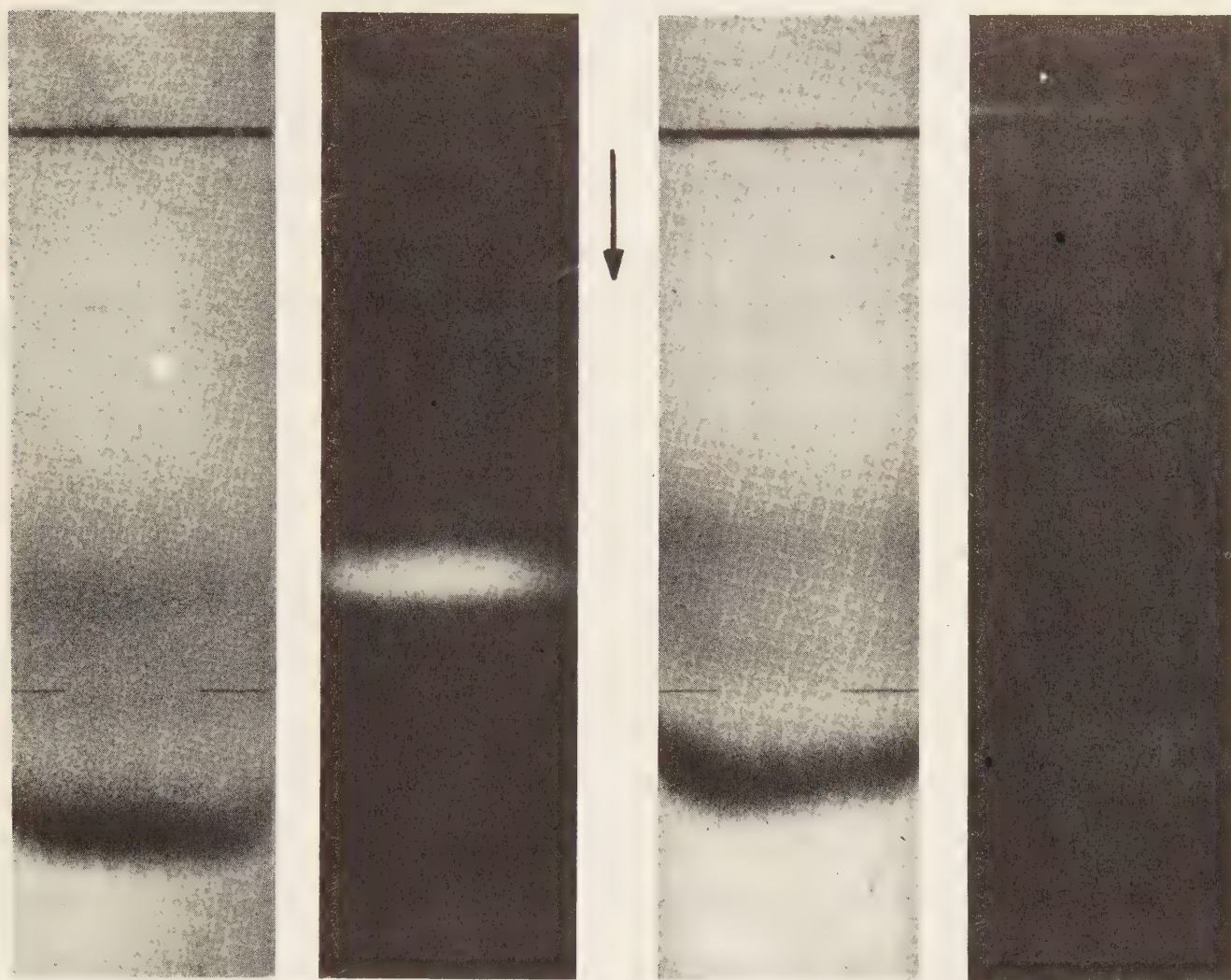


Figure 5 - Migration rhéoelectrophorétique d'une partie aliquote de :

- a - Une fraction iodée recueillie après filtration sur Séphadex G 100 (1 nanogramme de TSH bovine ^{131}I par ml, dans du tampon véronal 0,05 M, pH 8,6, 2,5% d'albumine humaine, sérum de cobaye normal 1:100).
 - b - La même fraction en présence d'un immunosérum de cobaye anti-TSH bovine à la dilution finale de 1:1000
 - c - La même fraction en présence du même antisérum et d'un excès de TSH bovine non iodée (500 nanogrammes par ml). Incubation pendant 15 heures à $+4^{\circ}\text{C}$. Dépôt de 100 microlitres contenant 20 microlitres de sérum de mouton sur papier de cellulose Whatman 3 MC (4cm de large).
- Conditions de migration indiquées à la légende de la figure 1.

B. TSH- ^{131}I + ANTICORPS ANTI-B TSH B. TSH- ^{131}I + ANTICORPS ANTI-B. TSH
 + Excès de B. TSH non iodée.



a

b

Figure 6 - Autoradiographie d'un fractionnement par 120 minutes de
 rhéophorèse suivie de 4 heures d'électrophorèse (12 v/cm).
 Papier Whatman 3 MC.

- a - TSH bovine - ^{131}I + anticorps anti-TSH bovine (dilution au 1:100).
- b - TSH bovine - ^{131}I + anticorps anti-TSH bovine, en présence d'un
 excès de TSH bovine non iodée.

Incubation pendant 24 heures à + 4°C.

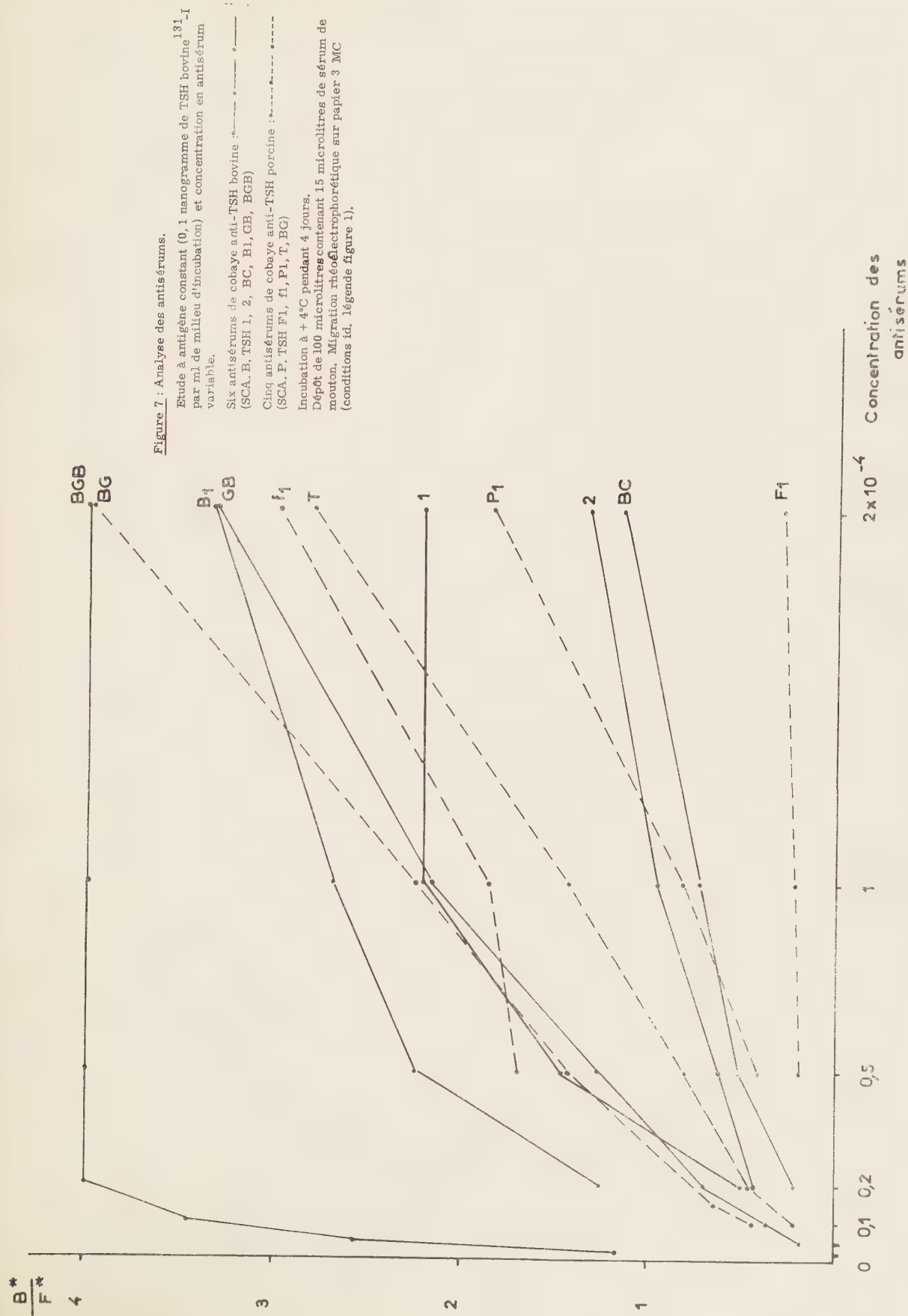
solution de marquage nous a permis de séparer des fractions immunologiquement réactives (fractions moyennement retardées du pic protéique) et des fractions moins réactives. Après électrophorèse en gel d'amidon, les fractions les plus réactives immunologiquement ont été obtenues entre 3 et 6 cm de l'origine. La chromatographie sur colonne de résine IRA 400 ou sur poudre de cellulose ne nous a pas permis, dans les conditions utilisées, d'isoler une fraction immunologiquement réactive dans sa totalité. Nous avons vérifié que les fractions immunologiquement réactives, recueillies après passage sur Séphadex G 100 de la solution de marquage, étaient totalement liées par un antisérum spécifique (fig. 6).

IV - ETUDE DES ANTISERUMS

1°) Détection des anticorps

Tous les antisérums anti-TSH bovine étudiés ont lié, de façon spécifique, la TSH bovine radio-iodée. En l'absence d'antisérum spécifique, aucune liaison n'a été observée entre la TSH bovine - 131 I et le sérum de cobaye normal qui se trouve, à la dilution finale de 1:100, dans le tampon utilisé pour toutes les incubations. Les anticorps liant la TSH bovine marquée migrent dans la zone des gamma-globulines (fig. 6). La liaison est totalement inhibée par un excès de TSH bovine non iodée (fig. 6). Aux très faibles concentrations d'antigène et d'anticorps utilisées, le complexe hormone-anti-hormone est soluble.

Avec certains antisérums, dans des conditions d'incubation identiques, nous avons observé que la fraction de l'activité hormonale migrant avec les protéines de façon spécifique (B*) était plus faible lorsque la séparation avait été réalisée sur du papier de DEAE-cellulose plutôt que sur



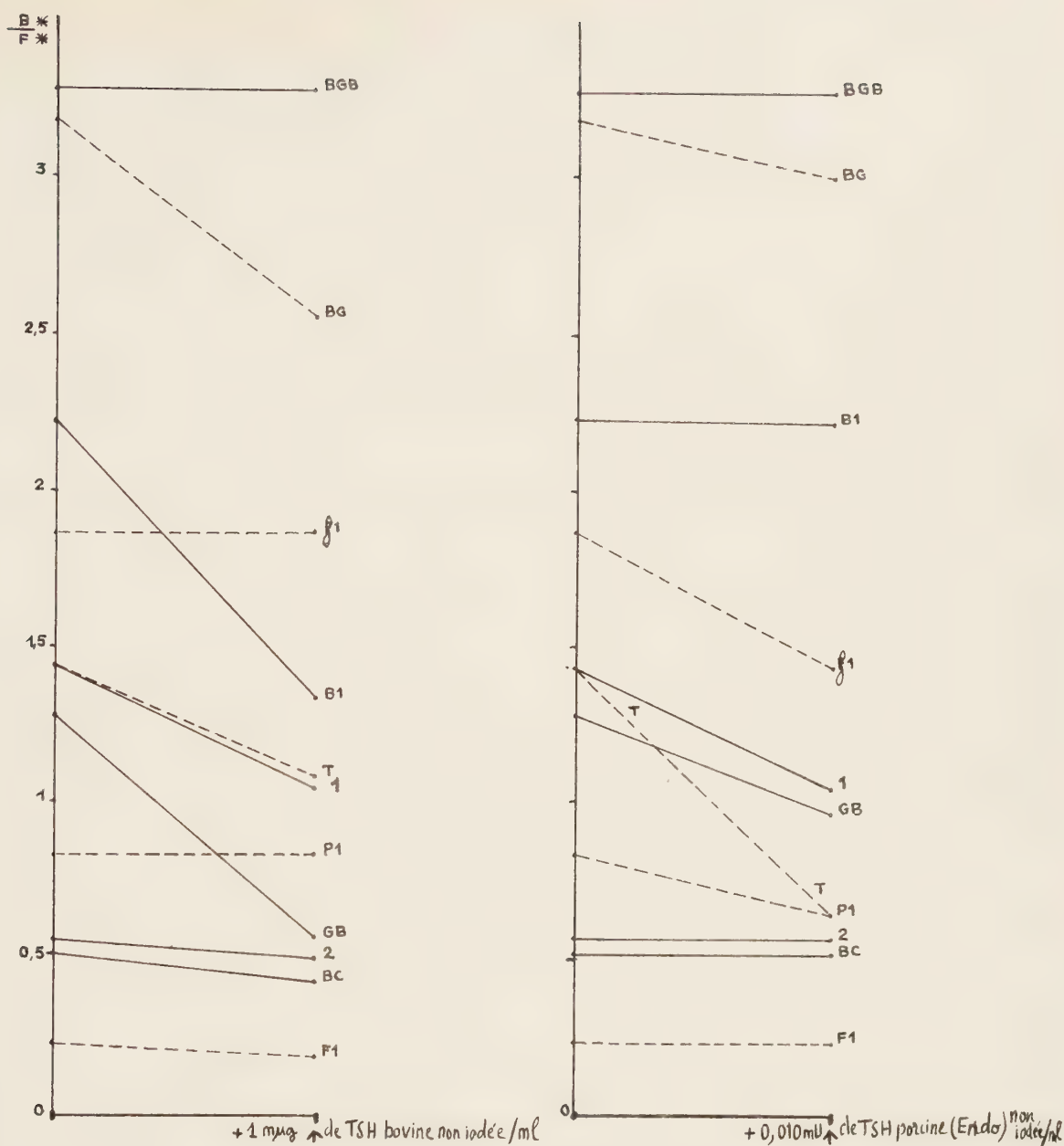


Figure 8 : Analyse des antisérums

Etude à anticorps constant et antigène variable.

Traceur : 0,1 nanogramme de TSH bovine ^{131}I -I/ml.

Antisérums de cobaye anti-TSH bovine à la dilution finale de 1 : 20.000 : — (SCA, B. TSH)

Antisérums de cobaye anti-TSH porcine à la dilution finale de 1 : 10.000 : - - - - - (SCA, P. TSH)

Les systèmes les plus sensibles de la série sont ceux utilisant les SCA, B. TSH "B1" et "GB", à la dilution finale constante de 1 : 20.000, en présence des standards de TSH bovine purifiée non iodée, et le SCA, P. TSH "T", à la dilution finale constante de 1 : 10.000, en présence des standards de TSH porcine Endo non iodée.

Conditions d'incubation et de migration rhéoelectrophorétique identiques à celles de la figure 7.

du papier de cellulose 3 MC, dans les conditions protéiques respectives de l'analyse rhéoelectrophorétique déjà définies pour ces deux types de papier. Il est possible que les différences observées résultent d'une plus grande affinité, pour le papier de DEAE-cellulose, de la TSH bovine utilisée. Cette plus grande affinité paraît susceptible d'entraîner une dissociation du complexe antigène-anticorps lors de la migration, surtout si l'énergie de la liaison hormone-anticorps anti-hormone est faible.

2°) Etude quantitative des immunosérums anti-TSH bovine et anti-TSH porcine.

Six antisérums de cobaye anti-TSH bovine et cinq antisérums de cobaye anti-TSH porcine ont été étudiés à dilutions croissantes en présence d'une quantité constante de TSH bovine radio-iodée (0,1 nanogramme par ml). A l'exception de l'un d'entre eux (F1), tous les antisérums anti-TSH porcine ont lié la TSH bovine dans des proportions comparables (quoique légèrement inférieures) à celles observées avec les antisérums anti-TSH bovine (fig. 7). Les immunosérums dont la concentration en anticorps semble la plus grande proviennent des animaux dont l'immunisation a été prolongée.

L'adjonction au milieu d'incubation de TSH bovine purifiée non iodée (1 nanogramme par ml de milieu d'incubation, ce qui représente 10 fois la quantité de traceur présente dans le même milieu) entraîne, selon l'immunosérum étudié à une dilution déterminée, une baisse franche, ou seulement appréciable, ou nulle, du rapport $\frac{B^*}{F^*}$. La baisse du rapport $\frac{B^*}{F^*}$ a été observée, dans ces conditions, pour quatre des six antisérums anti-TSH bovine, et pour deux des cinq antisérums anti-TSH porcine (fig. 8).

Avec l'adjonction de TSH porcine commerciale (α) (environ 0,010

(α) Thyréostimuline Endo.

	% d'activité liée par rapport à l'activité totale "corrigée" .		
	En l'absence de TSH non iodée	En présence d'un excès de :	
		TSH bovine	TSH porcine
SCA. B. TSH	85	20	60
SCA. P. TSH	80	45	20

TABLEAU I

Liaison de la TSH bovine radio-iodée par un antisérum de cobaye anti-TSH bovine (SCA. B. TSH) et par un antisérum de cobaye anti-TSH porcine (SCA. P. TSH), en l'absence de TSH non iodée et en présence d'un excès de TSH non iodée bovine ou porcine.

Traceur : 0,1 nanogramme de TSH bovine ¹³¹I par ml de milieu d'incubation.

Hormone non iodée : 100 nanogrammes de TSH bovine purifiée, et 0,7 mU de TSH porcine Endo, par ml de milieu d'incubation.

SCA. B. TSH et SCA. P. TSH à la dilution finale de 1 :1000

Incubation à + 4°C pendant 4 jours.

Migration rhéoelectrophorétique sur papier 3 M. C. (conditions identiques à celles de la figure 5).

milliunités par ml de milieu d'incubation), la décroissance du rapport $\frac{B^*}{F^*}$ est nette pour quatre des cinq antisérums anti-TSH porcine et pour deux des six antisérums anti-TSH bovine (fig. 8). Pour utiliser des "standards" de TSH porcine (α) (hormone non purifiée, titrant 0,7 à 0,8 u. USP/mg) approximativement équivalents en activité biologique aux standards de TSH bovine purifiée (Dr Condliffe, 40 U.I./mg en juillet 1964), nous avons estimé que l'activité de cette dernière préparation était de 10 à 15 U.I./mg au cours des expériences effectuées (septembre 1965).

Une inhibition de la liaison TSH bovine - ^{131}I - anticorps anti-TSH bovine ou anti-TSH porcine a été observée lorsque le milieu d'incubation comportait de la TSH non iodée, homologue par rapport à l'antisérum anti-TSH, et en excès par rapport au traceur hormonal; en présence d'un excès (estimé approximativement équivalent) d'hormone non iodée hétérologue, l'inhibition observée n'a été que partielle (tableau I).

3°) Nous n'avons observé aucune liaison entre la TSH bovine radio-iodée d'une part, un antisérum de cobaye anti-ACTH porcine et un antisérum de cobaye anti-hormone somatotrope humaine d'autre part (fig. 9).

V - ETUDE QUANTITATIVE DU SYSTEME TSH BOVINE RADIO-IODEE - ANTICORPS ANTI-TSH BOVINE ET ANTI-TSH PORCINE.

1°) Les courbes "standard" obtenues en analysant un tel système en présence de quantités connues croissantes de TSH bovine non iodée sont représentées sur les figures 10 (rhéoelectrophorèse sur papier 3 MC) et 11 (immunoprécipitation du complexe hormone-anticorps de cobaye par un sérum de lapin anti-globulines de cobaye).

(α) Thyréostimuline Endo.

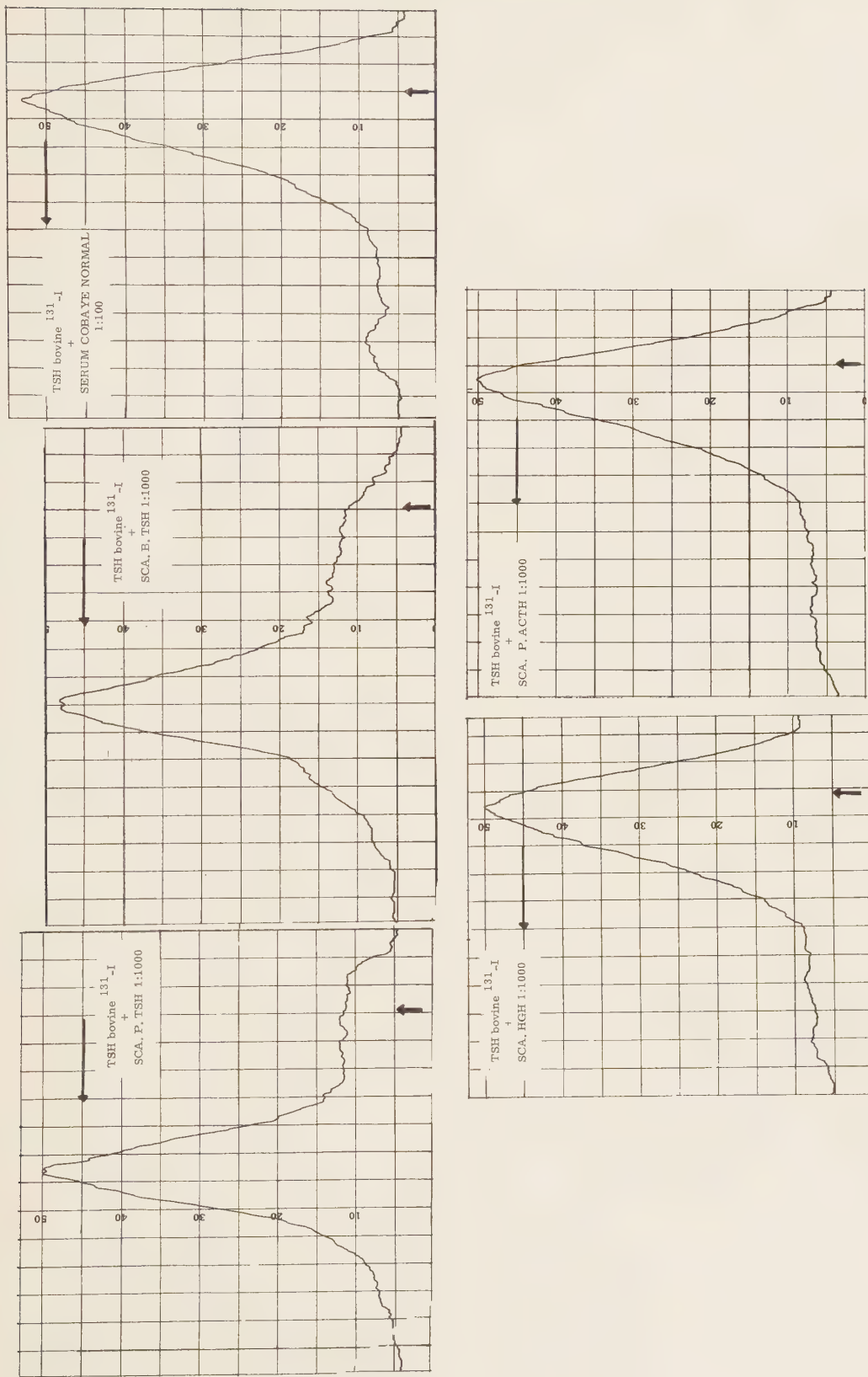


Figure 9 : Absence de liaison entre la TSH bovine ^{131}I d'une part, un sérum de cobaye non immunisé, un antiserum de cobaye anti-ACTH porcine (SCA, P, ACTH) et un antiserum de cobaye anti-hormone somatotrope humaine (SCA, HGH), d'autre part. Liaison de la TSH bovine ^{131}I par un antiserum de cobaye anti-TSH bovine (SCA, B, TSH) et par un antiserum de cobaye anti-TSH porcine (SCA, P, TSH).

Incubation pendant 4 jours à + 4°C.

Migration rhéoelectrophorétique sur papier 3 MC (4 cm de large)

Dépôt de 100 microlitres contenant 20 microlitres de sérum de

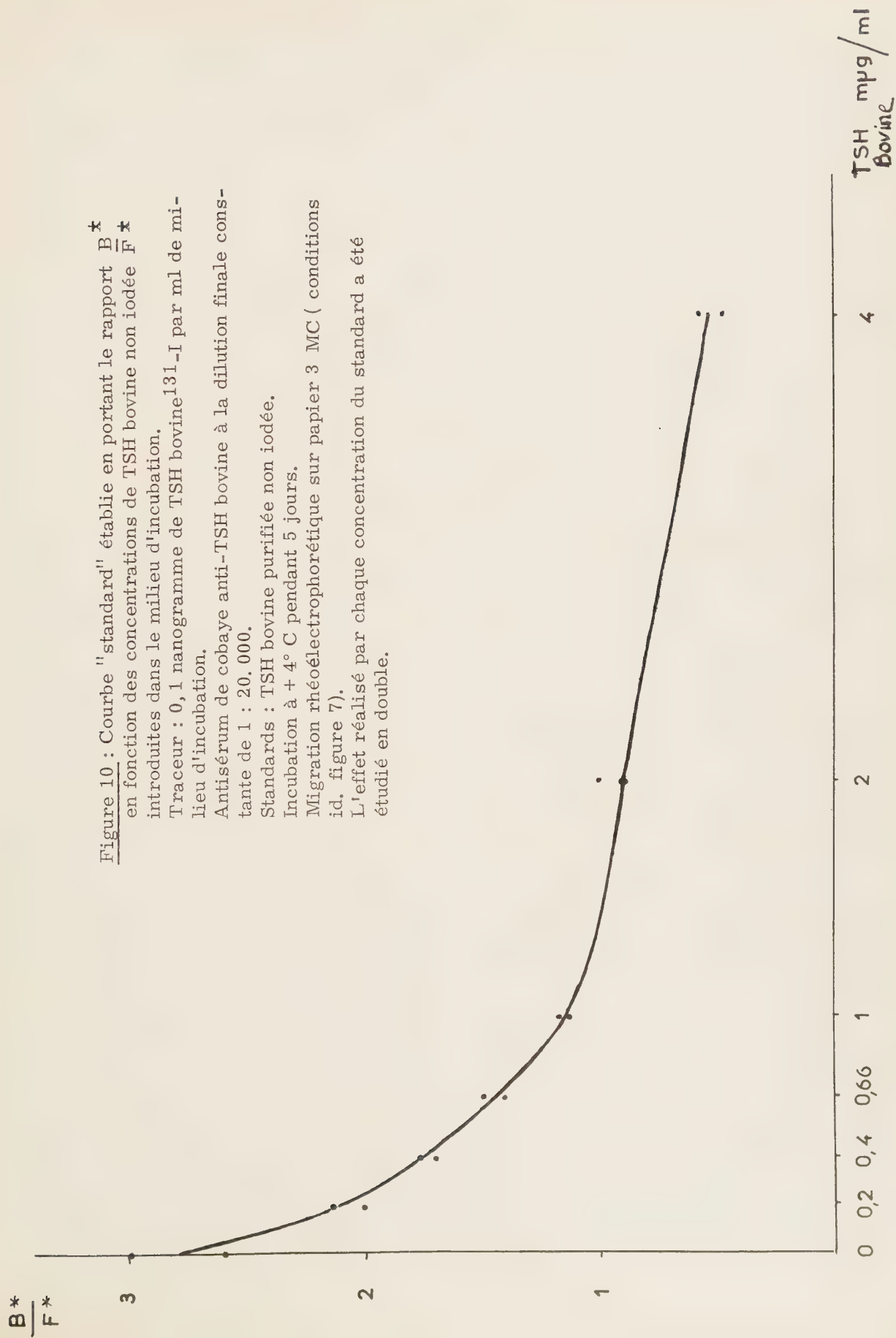


Figure 11 - Courbe "standard" établie en portant le pourcentage d'activité précipitée en fonction des concentrations de TSH bovine non iodée introduites dans le milieu d'incubation.
Conditions d'incubation identiques à celles de la figure 10 (mais le tampon ne comporte pas de sérum de cobaye normal au 1:100).
Précipitation secondaire du complexe hormone-anticorps de cobaye par un sérum de lapin anti-globulines de cobaye.

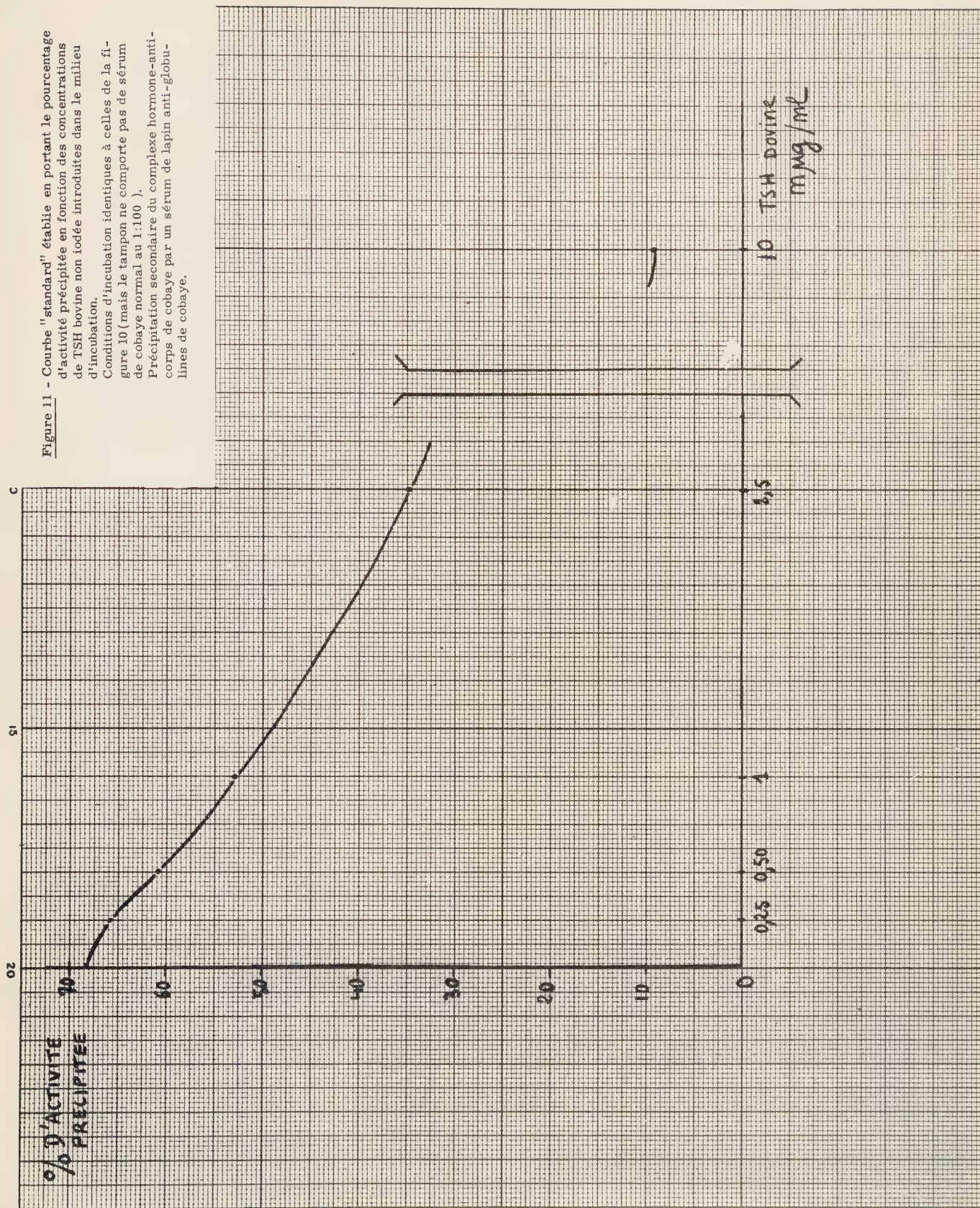
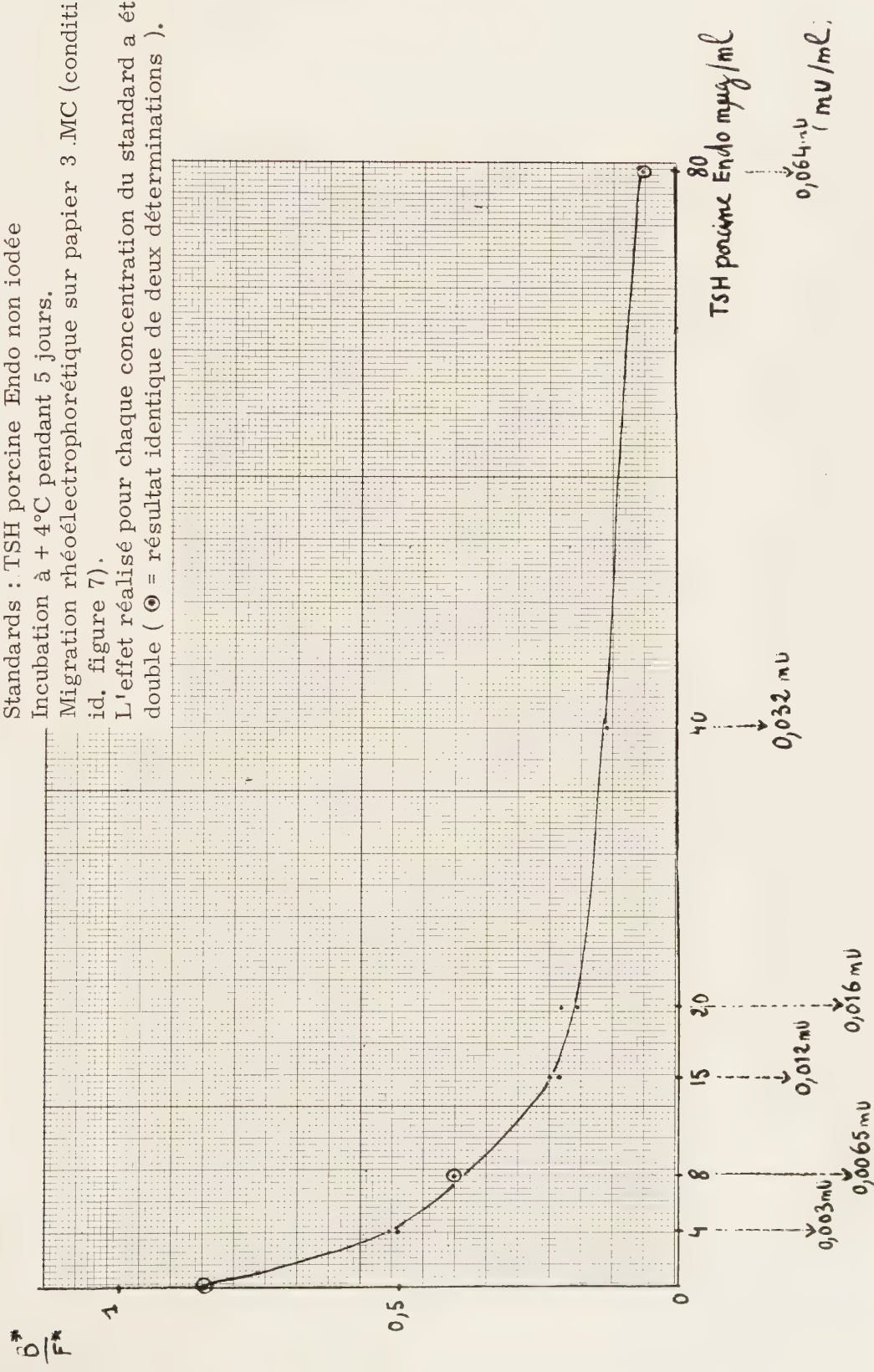


Figure 12 - Courbe "standard" établie en portant le rapport $\frac{B^*}{F^*}$ en fonction des concentrations de TSH porcine non iodée $\overline{F^*}$ introduites dans le milieu d'incubation.
 Traceur : 0,1 nanogramme de TSH bovine $^{131}\text{-I}$ par ml de milieu d'incubation.
 Antisérum de cobaye anti-TSH porcine à la dilution finale constante de 1 : 10.000.
 Standards : TSH porcine Endo non iodée
 Incubation à + 4°C pendant 5 jours.
 Migration rhéoelectrophorétique sur papier 3.MC (conditions id. figure 7).
 L'effet réalisé pour chaque concentration du standard a été étudié en double ($\odot$ = résultat identique de deux déterminations).



2°) La figure 12 représente la courbe "standard" obtenue en analysant un système TSH bovine - ^{131}I - anticorps anti-TSH porcine en présence de quantités connues croissantes de TSH porcine non iodée.

3°) Nous avons comparé les effets observés avec quelques plasmas humains sur le système de référence TSH bovine radio-iodée - anticorps anti-TSH bovine et, avec certains d'entre eux, sur un système TSH bovine - ^{131}I - anticorps anti-TSH porcine. L'analyse a été effectuée par rhéoelectrophorèse sur papier 3 MC. La sensibilité des courbes standard ne nous a pas encore permis de déterminer avec précision des valeurs inférieures à 2,5 nanogrammes (de TSH bovine purifiée) par ml de plasma non dilué. Chaque plasma a été étudié à des dilutions finales, dans le milieu d'incubation, de : 1 : 10, 1 : 25, 1 : 50, et de 1 : 5 pour certains d'entre eux. Pour chaque dilution des plasmas, des incubations témoin ne comportant que le plasma et le traceur hormonal dans du tampon, sans anticorps, sont effectuées de façon à apprécier, lors de l'analyse rhéoelectrophorétique, le degré de la migration non spécifique avec les protéines de l'hormone iodée. Nous avons observé, avec certains plasmas, une diminution appréciable du rapport $\frac{B^*}{F^*}$. Les résultats figurent sur le tableau II. Ils sont exprimés, en nanogrammes/ml, par rapport à un "standard" de TSH bovine purifiée dont nous ignorons l'activité biologique actuelle (celle-ci était de 40 U.I./mg en juillet 1964, nous avons très grossièrement estimé qu'elle était de l'ordre de - ou légèrement inférieure à -10 U.I./mg lors de ces études, effectuées en décembre 1965). Les valeurs obtenues sont, en particulier en ce qui concerne les plasmas d'hypothyroïdiens primaires, très notablement inférieures aux valeurs observées avec de tels plasmas par les techniques de dosage radio-immunologique utilisant un système entièrement homologue humain; dans ce système, les résultats sont exprimés par rapport

à un standard de TSH humaine purifiée dont l'activité biologique est de 10 U.I./mg lors des dosages (26, 35). Le trop faible degré de la réaction croisée entre la T.S.H. plasmatique humaine et les systèmes que nous avons utilisés ne nous a donc permis, jusqu'à présent, qu'une détection radio-immunologique des plasmas humains particulièrement riches en TSH.

°
° °

OBSERVATIONS	DIAGNOSTIC	TSH NANOGRAMMES/ml DE PLASMA (STANDARDS : TSH BOVINE PURIFIEE)	IODE PLASMATIQUE (x) "HORMONAL" (µg/100ml)
TCH... 35 ♂	SUJET NORMAL	< 2, 5	
GRA... 22 ♀	SUJET NORMAL	< 2, 5	
FIN ... ♀ (a)	HYPOTHYROIDIE PRIMAIRE	8	
SCH ... 20 ♀ (b)	HYPOTHYROIDIE PRIMAIRE (Thyroïde ectopique)	3	1, 5
HUR... 39 ♀ (b)	HYPOTHYROIDIE PRIMAIRE	4	0, 8
MAR... 51 ♀ (b)	HYPOTHYROIDIE PRIMAIRE	9	0, 4
BER... 50 ♀ (b)	HYPOTHYROIDIE (PAR DES- TRUCTION ISOTOPIQUE DE LA THYROÏDE)	6	1, 4
DES... ♀ (a)	HYPERTHYROIDIE (AVEC EXOPHTALMIE ET MYXOE- DEME PRETIBIAL)	< 2, 5	
KER ... 74 ♀ (b)	HYPERTHYROIDIE (GOÏTRE SECONDAIREMENT TOXIQUE)	< 2, 5	
GOU... 20 ♀ (b)	GOÏTRE EUTHYROIDIEN	< 2, 5	7, 4
DAO ... ♂ (a)	ACROMEGALIE	< 2, 5	
GOE... ♂ (a)	HYPOPITUITARISME	< 2, 5	

TABLEAU II - Valeurs obtenues chez 12 sujets, exprimées par rapport à un standard de TSH bovine purifiée.

Prélèvements du à l'obligeance :

a - du Pr AZERAD et du Pr Agr. LUBETZKI

b - du Pr DECOURT et des Prs Agr. J. L. DE GENNES et MAUVAIS-JARVIS.

(x) : extraction sur résine (Mme PIETTE, Pharmacie de la Pitié).

Chapitre III - D I S C U S S I O N

La méthode radio-immunologique de Berson et Yalow nous a permis, à l'aide d'une préparation de TSH bovine hautement purifiée et marquée par l'iode 131, de mettre en évidence des anticorps anti-TSH dans des antisérums de cobayes immunisés avec une TSH bovine commerciale.

Nous avons également observé une réaction immunologique croisée entre la TSH bovine radio-iodée et des antisérums de cobayes immunisés avec une TSH porcine commerciale. La comparaison quantitative des effets de la TSH bovine purifiée et de la TSH porcine commerciale non iodées sur un système TSH bovine -¹³¹I - anticorps anti-TSH bovine ou anti-TSH porcine a été difficile pour plusieurs raisons :

1 - Inégalité des activités biologiques des préparations utilisées comme "standards" : l'activité de la TSH bovine hautement purifiée était initialement de 40 U.I./mg; celle de la TSH porcine commerciale est de l'ordre de 0,7 à 0,8 U.I./mg.

2 - Instabilité, en ce qui concerne l'activité biologique, de la préparation de TSH bovine hautement purifiée qui présente, avec le temps, un déclin appréciable de son activité.

3 - Relative instabilité de la TSH bovine hautement purifiée, dans son comportement immunologique apprécié par la méthode radio-immunologique; il est possible que cette

instabilité soit liée aux conditions de conservation, en particulier à la concentration de l'hormone en solution (conservée congelée), car il nous a semblé que les solutions les plus diluées perdaient, avec le temps, une partie de leur réactivité immunologique.

4 - Impossibilité actuelle d'estimer avec précision le degré de proportionnalité entre le déclin de l'activité biologique et la baisse de la réactivité immunologique.

Divers travaux font état de réactions immunologiques croisées entre différentes TSH animales. Ainsi, l'action biologique de la TSH endogène de rats (5, 17, 28), de souris et de cobayes (17), a pu être inhibée par un antisérum de lapin anti-TSH bovine. Les études concernent surtout les TSH bovine et humaine. Certains auteurs (1, 6, 19, 25, 37, 40) ont observé une neutralisation plus ou moins complète de l'activité biologique thyroïdienne de sérums de sujets myxoédémateux primaires (ou d'extraits pituitaires humains) par des antisérums de lapin anti-TSH bovine. Cependant, des études quantitatives (23, 34) ont précisé que la neutralisation de l'activité biologique de la TSH humaine nécessitait des quantités de sérum anti-TSH bovine cinq à vingt-cinq fois plus élevées que celles requises pour une neutralisation équivalente de l'action biologique de la TSH bovine. Ces différences sont encore plus marquées lorsque la réaction croisée a été appréciée par des techniques purement immunologiques. Ainsi, si Werner (39) a pu observer, avec un système comportant des hématies servant de support à une TSH bovine et un antisérum anti-TSH bovine, une inhibition de l'hémagglutination environ dix fois plus faible par une préparation de TSH humaine que celle réalisée par une TSH homologue, Arquilla et Coll. (3) n'ont obtenu ni hémagglutination avec un antisérum anti-TSH hétérologue, ni inhibition de l'hémagglutination homologue.

par une TSH hétérologue. Utiger, Odell et Condliffe (34) n'ont pas observé de précipitation, lors d'études d'immuno-diffusion en gel d'agar, entre une TSH humaine purifiée et un antisérum anti-TSH bovine purifiée, ni entre une TSH bovine purifiée et un antisérum anti-TSH humaine purifiée, malgré des concentrations allant jusqu'à cent fois celles requises pour observer une réaction dans le système homologue. Ces mêmes auteurs (34), utilisant la méthode radio-immunologique avec immuno-précipitation secondaire du complexe antigène-anticorps, n'ont détecté qu'un effet inhibiteur minime d'une TSH humaine purifiée sur la liaison d'un système TSH bovine purifiée radio-iodée-anticorps anti-TSH bovine purifiée. Par contre, Oki et coll. (27) ont mis en évidence, à la fois par neutralisation de l'effet biologique thyroïdrotrope, immuno-précipitation, hémagglutination et inhibition de l'hémagglutination, une réaction croisée entre un antisérum anti-TSH porcine et diverses préparations de TSH humaine.

La détermination du taux plasmatique de la TSH chez l'homme, par diverses techniques utilisant la méthode radio-immunologique, se heurte à un certain nombre de difficultés et tout particulièrement au caractère généralement discret de la réaction croisée entre la TSH humaine et les antisérums anti-TSH animales, ce qui rend aléatoire la détection des quantités minimales de TSH présentes dans le plasma de sujets normaux ou porteurs d'affections thyroïdiennes, hormis les cas d'hypothyroïdie primaire où l'élévation de la TSH endogène serait suffisante pour pouvoir être décelée. Ainsi, le trop faible degré de la réaction croisée avec les systèmes utilisés ne nous a permis une détection radio-immunologique de la TSH humaine que dans les plasmas particulièrement riches en TSH endogène. Toutefois, le trop petit nombre de plasmas étudiés jusqu'à présent ne nous permet pas de préciser d'une façon définitive le degré de la réaction croisée avec les systèmes employés. Pour la même raison, il nous

est impossible de conclure à une réaction croisée plus marquée avec le système comportant des anticorps anti-TSH porcine plutôt que des anticorps anti-TSH bovine.

Si des quantités minimales de TSH humaine purifiée, de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes, suffisent pour l'iodation et pour la préparation des standards d'hormone humaine non iodée, les quantités requises pour l'obtention des antisérums sont beaucoup plus élevées (de l'ordre de plusieurs milligrammes) et d'obtention difficile. De telles préparations de TSH humaine purifiée ont permis à Utiger (35), à Odell et coll. (26), de déterminer le taux plasmatique de la TSH humaine avec un système entièrement homologue comportant une TSH humaine radio-iodée, des anticorps anti-TSH humaine, et des standards d'hormone humaine. Cependant, Lemarchand-Béraud et coll. (22) ont utilisé un système TSH bovine iodée - anticorps anti-TSH bovine, ce qui laisse supposer que l'antisérum anti-TSH bovine qu'ils emploient présente une réaction croisée suffisante avec la TSH humaine pour en permettre la détection plasmatique.

Une autre difficulté provient de l'instabilité des préparations hautement purifiées utilisées pour l'iodation et pour l'établissement des standards d'hormone non iodée en vue du dosage radio-immunologique.

C O N C L U S I O N S

1°) Nous avons marqué par l'iode 131 une préparation de TSH bovine hautement purifiée (Dr P.G. Condliffe). Des activités spécifiques comprises entre 200 et 300 microcuries par microgramme ont été obtenues. Les solutions comportant l'hormone iodée ont été soumises à diverses techniques de fractionnement. Elles ne sont pas apparues homogènes sur les différents milieux de fractionnement utilisés et ne se sont pas comportées de façon égale avec un immunosérum spécifique.

La migration rhéoelectrophorétique sur papier, selon la méthode de Berson et Yalow, nous a permis, dans des conditions protéiques définies, de séparer l'hormone libre de l'hormone liée aux anticorps. La liaison anticorps - hormone iodée a été inhibée de façon compétitive par l'hormone non iodée, l'inhibition étant totale avec un excès d'hormone non iodée. Nous avons vérifié que les fractions iodées les plus réactives immunologiquement étaient totalement liées par un immunosérum spécifique.

La TSH bovine purifiée et radio-iodée a été liée par des antisérums de cobayes immunisés avec une TSH bovine commerciale non purifiée. Aucune liaison n'a été observée avec des sérums de cobayes non immunisés, ni avec un antisérum de cobaye anti-A.C.T.H. porcine ou avec un antisérum de cobaye anti-hormone somatotrope humaine. Tous les antisérums anti-TSH étudiés ont lié, à des degrés variables, la TSH bovine - 131 I. Une liaison a été observée avec des dilutions échelonnées entre le 1 : 1000 et le 1 : 500 000

pour certains immunsérums. Après sélection des antisérums, étudiés à concentration variable en présence d'une quantité minime constante de traceur hormonal, nous avons étudié la liaison TSH bovine radio-iodée - anticorps anti-TSH bovine en présence de quantités croissantes de TSH bovine non iodée.

2°) Une réaction immunologique croisée entre la TSH bovine purifiée radio-iodée et des antisérums de cobayes immunisés par une TSH porcine commerciale non purifiée a été observée. Dans des conditions identiques d'incubation et d'analyse rhéoelectrophorétique, nous avons généralement observé un pourcentage d'activité liée aux anticorps anti-TSH porcine légèrement plus faible que celui obtenu avec des anticorps anti-TSH bovine aux mêmes dilutions des antisérums. L'effet inhibiteur sur la liaison TSH bovine - ^{131}I - anticorps anti-TSH bovine ou anti-TSH porcine a été plus marqué avec l'hormone non iodée homologue. Dans les conditions expérimentales utilisées, la réaction croisée que nous avons observée est donc plus faible que la réaction directe.

3°) Nous avons étudié quelques plasmas humains avec des courbes "standard" comportant un système TSH bovine - ^{131}I - anticorps anti-TSH bovine et TSH bovine - ^{131}I - anticorps anti-TSH porcine. Nous n'avons observé aucun effet sur la liaison TSH bovine radio-iodée - anticorps anti-TSH bovine ou anti-TSH porcine avec des plasmas de sujets enthyroïdiens ou hyperthyroïdiens, ni avec un plasma d'acromégale et un plasma d'insuffisant antéhypophysaire. Un effet inhibiteur discret sur la liaison hormone iodée - anticorps a été constaté avec certains plasmas de myxoedémateux primaires, non traités. Le degré de la réaction croisée entre la TSH plasmatique humaine et les systèmes que nous avons utilisés nous paraît être faible puisque nous avons trouvé,

chez ces hypothyroïdiens, dans les conditions employées, des valeurs plasmatiques environ cinq à vingt fois plus faibles que celles habituellement observées avec de tels plasmas par les techniques de dosage radio-immunologique utilisant un système entièrement homologue humain.

Il ne nous paraît cependant pas déraisonnable d'espérer une réaction croisée entre un antisérum anti-TSH animale et la TSH humaine, suffisante pour permettre une détermination des valeurs plasmatiques par la méthode radio-immunologique sans avoir à préparer des antisérums anti-TSH humaine (ce qui nécessiterait des quantités relativement importantes d'hormone humaine), lorsque nous pourrons disposer, pour l'iodation et la préparation des standards de référence, d'une quantité minime de TSH humaine purifiée.

Vu, le Président de Thèse :

Professeur M. DEROT

Vu, le Doyen de la Faculté :

Professeur G. BROUET

Vu, et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ADAMS D.D., KENNEDY T.H., PURVES H.D., SIRETT N.E.
Failure of TSH antisera to neutralize long-acting thyroid stimulator.
Endocrinology, 1962, 70, 801.
- 2 - ANDERSON E.M., COLLIP J.B.
Preparation and properties of an antithyrotropic substance.
Lancet, 1934, 1, 784.
- 3 - ARQUILLA E.R., CATZ B., FINN J.
Immunological studies with partially purified bovine and human thyrotropin.
J. Immunol., 1963, 90, 843.
- 4 - BASCHIERI L.
Inhibition de la thyroéostimuline endogène et exogène par des sérums anti-TSH de boeuf.
Rev. Franç. Endocr. Clin., 1962, 3, 290.
- 5 - BASCHIERI L., NEGRI M., DE LUCA F., SERENO L., CRAMAROSSA L.
Inhibition of endogenous thyrotropin in rats by antiserum to bovine thyrotropin.
Experientia, 1962, 18, 144.
- 6 - BECK J.C., Mac KENZIE J.M., FISHMAN J., GOSSELIN L., Mac GARRY E.E.
Some studies with antiserum to thyrotropin.
Ciba Found. Colloq. Endocrin. Immunoassay of hormones, 1962, 14, 238.
- 7 - BERSON S.A., YALOW R.S., BAUMAN A., ROTHSCHILD M.A., NEWERLY K.
Insulin I₁₃₁ metabolism in human subjects : demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J. Clin. Invest., 1956, 35, 170.
- 8 - BERSON S.A., YALOW R.S.
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody.
J. Clin. Invest., 1959, 38, 1996
- 9 - BERSON S.A., YALOW R.S., GLICK S.M., ROTH J.
Immunoassay of protein and peptides hormones.
Metabolism., 1964, 13, 1135.

- 10 - CLINE M.J., SELENKOW A., BROOKE M.S.
Inhibition of thyrotropin activity by immunologically specific antiserum.
Endocrinology, 1960, 67, 273.
- 11 - COLLIP J.B., ANDERSON E.M.
The production of serum inhibitory to the thyrotropic hormone.
Lancet, 1934, 1, 76.
- 12 - CONDLIFFE P.G., BATES R.W., FRAPS R.M.
Fractionation of bovine thyrotropin and luteinizing hormone on cellulose ion exchange columns.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 1959, 34, 430.
- 13 - CONDLIFFE P.G.
Purification of human thyrotrophin.
Endocrinology, 1963, 72, 893.
- 14 - COPE C.L.
Effect of antithyrotropic serum on the action of human thyrotropic hormone.
Lancet, 1938, 1, 888.
- 15 - DEROT M., ROSSELIN G., ASSAN R., FREYCHET P., DROUET J., TCHOBROUTSKY G.
Dosage radio-immunologique des hormones protéiques plasmatiques.
Actualités Médicales de l'Hôpital Broussais. 1 vol. Expan. Sci. Franç., Paris, 1965.
- 16 - FISHMAN J., Mac GARRY E.E., BECK J.C.
Studies using anterior pituitaries hormones as antigens.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1959, 102, 446.
- 17 - GARCIA A.M., SELENKOW H.A.
Immunologic inhibition of endogenous or exogenous thyrotropin in various species.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1964, 116, 467.
- 18 - HALES C.N., RANDLE P.J.
Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate.
Biochem. J., 1963, 88, 137.
- 19 - HAYS M.T., SOLOMON D.H., WERNER S.C.
The effect of purified bovine thyrotropin in man. Loss of effectiveness with prolonged administration.
J. Clin. Endocr., 1961, 21, 1475.
- 20 - HENNEN G., WINAND R.
Essai d'étude immunologique de la thyroïdostrophine et du facteur exophthalmogène.
Rev. Franç. Etud. Clin. Biol., 1963, 8, 476.

- 21 - HUNTER W.M., GREENWOOD F.C.
Preparation of Iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature, 1962, 194, 495.
- 22 - LEMARCHAND-BERAUD Th., FELBER J.P., VANNOTTI A.
Développement d'une méthode radio-immunologique pour la détermination de la thyroéostimuline. Résultats préliminaires.
Schweiz. Med. Wschr., 1965, 95, 772.
- 23 - LEVY R.P., Mac GUIRE W.L., HEIDEMAN M.L.
Quantitative studies of the reaction of bovine thyrotropin antiserum with human and bovine thyrotropin preparation.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1962, 110, 598.
- 24 - Mac GARRY E.E., BECK J.C., AMBE L., NAYAK R.
Some studies with antisera to growth hormone, adrenocorticotrophin and thyrotropin.
Recent. Progr. Hormone Res., 1964, 20, 1.
- 25 - Mac KENZIE J.M., FISHMAN J.
Effects of antiserum in bioassay of thyrotropin and thyroid activator of hyperthyroidism.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1960, 105, 126.
- 26 - ODELL W.D., WILBER J.F., PAUL W.E.
Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum.
J. Clin. Endocr., 1965, 25, 1179.
- 27 - OKI K., MIYAI K., IWATSUBO H., KUMAHARA Y., YOSHIDA T.
Immunological and biological demonstration of antibodies to hog and human thyrotropin.
Med. J. Osaka Univ., 1962, 13, 139.
- 28 - REICHLIN S., BOSHANS R.
Acute inhibition of thyroid function in the rat produced by rabbit antibody to bovine thyrotropin.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1962, 111, 139.
- 29 - ROSSELIN G., TCHOBROUTSKY G., ASSAN R., LELLOUCH J., DEROT M.
Etude radio-immunologique de la réaction insuline-anticorps anti-insuline.
Rev. Franç. Etud. Clin. Biol., 1965, 10, 1045.
- 30 - ROSSELIN G., TCHOBROUTSKY G., ASSAN R., DROUET J., DOLAIS J., FREYCHET P., DEROT M.
La méthode radio-immunologique d'étude des hormones protéiques de Berson et Yalow. Dosage plasmatique des hormones protéiques et de leurs anticorps chez l'homme.
Ann. Endoc. (Paris), 1965, 26, 449.

- 31 - SELENKOW H.A., PASCASIO F.M., CLINE M.J.
Immunobiological studies of thyrotropin.
Ciba Found. Colloq. Endocrin. Immunoassay of hormones,
1962, 14, 248.
- 32 - SKOM J.H., TALMAGE D.W.
Non precipitating insulin antibodies.
J. Clin. Invest., 1958, 37, 783.
- 33 - THOMSON D.L., COLLIP J.B., SELYE H.
Glandular physiology and therapy. The antihormones.
J. Amer. Med. Ass., 1941, 116, 133.
- 34 - UTIGER R.D., ODELL W.D., CONDLIFFE P.G.
Immunologic studies of purified human and bovine thyrotropin.
Endocrinology, 1963, 73, 359.
- 35 - UTIGER R.D.
Radioimmunoassay of human plasma thyrotropin.
J. Clin. Invest., 1965, 44, 1277.
- 36 - WERNER S.C.
The thyrotropic hormone and the antihormone problem.
Endocrinology, 1938, 22, 291.
- 37 - WERNER S.C., OTERO-RUIZ E., SEEAL B.C., BATES R.W.
Neutralisation of human serum and pituitary thyrotropic fractions
with antisera to bovine pituitary thyrotropin.
Nature (Lond.), 1960, 185, 472.
- 38 - WERNER S.C., SEEAL B.C., OSSERMAN E.F.
Immunologic and biologic characterization of antisera to bovine
thyrotropin.
J. Clin. Invest., 1961, 40, 92.
- 39 - WERNER S.C.
Some facets of thyrotropin immunoassay.
Ciba Found. Colloq. Endocrin. Immunoassay of Hormones, 1962, 14,
225.
- 40 - WERNER S.C.
Immune method of thyrotropin assay.
in Thyrotropin, 1963, Charles C. Thomas, Springfield, 297.
- 41 - YALOW R.S., BERSON S.A.
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J. Clin. Invest., 1960, 39, 1157.



EDITIONS A.G.E.M.P.
8 RUE DANTE
- PARIS V* -
ODÉ 58-90